

**Untersuchungen zum Einfluss niedrig dosierter
Glycin-, Pyruvat-, Resveratrol- und Nitrit-Infusionen
auf die Organschädigung, systemischen Folgen und
Inflammation im akuten lipopolysaccharid-
induzierten Schock der Ratte**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

im Fachbereich Chemie

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Tim Hamburger

aus Engelskirchen

2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2008 bis September 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. H. de Groot am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 12.12.2012

Gutachter:	Prof. Dr. Dr. H. de Groot
	Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann
Vorsitzende:	Prof. Dr. B Siebers

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Sepsis und septischer Schock	2
1.2. Die Immunpathogenese der Sepsis	3
1.3. Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit als potenzielle Schutzstoffe gegen die Folgen eines lipopolysaccharid-induzierten Schocks	4
1.3.1. Glycin.....	5
1.3.2. Pyruvat	6
1.3.3. Resveratrol	7
1.3.4. Nitrit	8
1.4. Problemstellung und Ziele der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Chemikalien, Pharmaka, Materialien und Geräte.....	10
2.2. Die Versuchstiere.....	12
2.3. Das Tiermodell, Versuchsplanung und Serien im Überblick	12
2.4. Die Versuchsgruppen	14
2.5. Versuchsdurchführung.....	15
2.5.1. Anästhesie und Analgesie.....	15
2.5.2. Katheterisierung der Femoral-Gefäße.....	15
2.5.3. Das Biomonitoring.....	16
2.5.4. Blutgasanalysen und Plasmagewinnung.....	17
2.5.5. Bestimmung des freien Hämoglobins und Nitrit + Nitrat-Gehalts im Plasma	17
2.5.6. Bestimmung der Markerenzymaktivitäten und der Zytokinkonzentrationen im Plasma.....	19
2.5.7. Blutbild und Gerinnung	19
2.5.8. Die organspezifischen Schädigungsparameter	20

2.5.8.1.	Die Organentnahme.....	20
2.5.8.2.	Wiegen der Organe und Probenentnahme.....	20
2.5.8.3.	Bestimmung des Nass-Trockengewichts des Dünndarms.....	21
2.5.8.4.	Makroskopische Bewertung des Dünndarms	21
2.5.8.5.	Gewinnung der Organhomogenate und Homogenatüberstände.....	22
2.5.8.6.	Hämoglobinkonzentration und Myeloperoxidaseaktivität in den Homogenatüberständen der Organe	23
2.5.8.7.	Zytokinmessungen in den verschiedenen Organen.....	23
2.6.	Histologie	24
2.6.1.	Färbung der histologischen Schnitte	24
2.6.2.	Histologische Befundung der Organe.....	25
3.	Ergebnisse.....	27
3.1.	Modelletablierungsserie (Serie 1)	27
3.1.1.	Effekte von Lipopolysacchariden auf den Blutdruck und andere Vitalparameter der Ratte.....	27
3.1.2.	Effekte von Lipopolysacchariden auf die Markerenzymaktivitäten sowie die Kreatinin- und Hämoglobinkonzentration im Plasma	29
3.1.3.	Effekte von Lipopolysacchariden auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter, Elektrolyte sowie den Hämoglobingehalt und Hämatokrit	31
3.1.4.	Effekte von Lipopolysacchariden auf die Schädigungsparameter des Dünndarms der Ratte.....	36
3.1.5.	Lipopolysaccharid-induzierte Veränderungen der Myeloperoxidaseaktivität und der Hämoglobinkonzentration in der Dünndarmwand, Niere, Leber und Lunge der Ratte	37
3.1.6.	Schlussfolgerungen aus der Modelletablierungsserie	39

3.2. Die Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit im lipopolysaccharid-induzierten Schock der Ratte (Serie 2 und 3)	40
3.2.1. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Organhistologie	40
3.2.2. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Hämoglobin-Konzentration im Gewebe des Dünndarms, der Niere, Leber und Lunge	42
3.2.3. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Organen.....	42
3.2.4. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Konzentrationen von freiem Hämoglobin und Nitrit + Nitrat im finalen Plasma sowie der Zytokine in den Organen	44
3.2.5. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen im Blutbild und der Gerinnung	47
3.2.6. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf den Blutdruck und andere Vitalparameter im lipopolysaccharid-induzierten Schock.....	49
3.2.7. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Blutgasanalyseparameter, Elektrolyte, metabolischen Parameter, Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits	50
3.2.8. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierte Freisetzung von Markerenzymen sowie den Anstieg der Kreatinin- und freien Hämoglobinkonzentration im Plasma	53
3.2.9. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Zytokinspiegel im Plasma.....	56
4. Diskussion.....	60
4.1. Systemische Parameter und Schutzstoffeffekte im akuten lipopolysaccharid-induzierten Schock der Ratte	60
4.2. Protektion vor der lipopolysaccharid-induzierten Gewebeschädigung	63

4.3. Anti-inflammatorische Eigenschaften von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit im akuten lipopolysaccharid-induzierten Schock	64
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	71
7. Anhang	79
7.1. Abkürzungen	79
7.2. Eigene Veröffentlichungen	80
7.3. Lebenslauf	82
7.4. Erklärung	83
7.5. Danksagung.....	84

1. Einleitung

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Patientenversorgung ist und bleibt die Sepsis („Blutvergiftung“) bzw. der septische Schock mit einer Sterblichkeitsrate von 35-60 % weltweit nach wie vor eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen (Christaki & Opal, 2008; Angus et al., 2006). Da es bei einer Sepsis initial vor allem aufgrund einer Vasoplegie und einer endothelialen Barrierefunktionsstörung des Gefäßsystems zu einem massiven Blutdruckabfall und somit zu einem septischen Schock kommen kann, sehen es heutige Therapiekonzepte als essenziell an, eine möglichst schnelle Volumensubstitution in Form kristalloider oder kolloider Lösungen zu gewährleisten. So soll die Makro- und Mikrozirkulation verbessert und eine Normalisierung des zellulären Sauerstoffhaushaltes erreicht werden. Des Weiteren stehen auch die Einleitung einer umfassenden Antibiotikatherapie sowie die Identifikation und Kontrolle der Infektionsquelle im Vordergrund (Niederbichler et al., 2009). Begleitend zu dem zuvor beschriebenen Kreislaufschock kommt es im Verlauf einer schweren Sepsis und im septischen Schock zu einer verminderten Pumpleistung des Herzens, der septischen Kardiomyopathie. Daher werden neben der Flüssigkeitssubstitution und Antibiotikagabe auch Inotropika (Medikamente zur Beeinflussung der Kontraktilität des Herzmuskels) appliziert (Merx & Weber, 2007; Müller-Werdan et al., 2006). Der aus der Vasoplegie, Barrierefunktionsstörung und Kardiomyopathie resultierende Blutdruckabfall führt zu einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in den Geweben und damit zu einer ischämischen Gewebhypoxie. Diese hat u. a. die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und somit direkt auch Gewebeschäden zur Folge. Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist die gravierende Dysregulation der Entzündungsreaktion des Immunsystems und der damit einhergehenden massiven Freisetzung von Zytokinen sowie Stickstoffmonoxid (NO). Letzteres ist ein potenter Vasodilator und hat damit einen negativen Einfluss auf den Blutdruck. Die Freisetzung der Zytokine aktiviert zusätzlich die intravaskuläre Koagulation und kann somit ebenfalls die Durchblutung der Gewebe negativ beeinflussen (Cohen, 2002). Schlussendlich führen alle diese pathophysiologischen Abläufe zu einer Hypoxie und Hypoperfusion im Gewebe und können durch Schädigung der verschiedenen Organe zu einem Multiorganversagen und damit zum Tode führen.

1.1. Sepsis und septischer Schock

Das aus dem Griechischen stammende Wort „Sepsis“ bezeichnete ursprünglich die Zersetzung von organischem Material in Anwesenheit von Bakterien und besteht seit gut 2.700 Jahren mit mehr oder weniger unveränderter Bedeutung (Geroulanos & Douka, 2006). In der heutigen Medizin wird unter diesem Begriff im Allgemeinen eine durch Bakterien, Viren oder Pilze ausgelöste Entzündungsreaktion des Organismus verstanden. Seit 1992 werden dabei vier verschiedene Härtegrade differenziert: Das systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS, englisch: „systemic inflammatory response syndrome“) ist definiert als eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems ungeachtet welcher Ursache. Bei einer Sepsis müssen sowohl eine Infektion als auch die systemische Entzündungsantwort gegeben sein. Als „schwere Sepsis“ wird eine Sepsis mit einhergehender Organdysfunktion (z. B. nach „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA) Score (Lopes Ferreira et al., 2001)) definiert, während die höchste dieser vier Stufen, der „septische Schock“, eine schwere Sepsis verbunden mit einer persistierenden Hypotension darstellt, welche nicht durch andere Ursachen ausgelöst wurde (Levy et al., 2003). In der nachfolgenden Tabelle sind die oben beschriebenen Definitionen nochmals übersichtlich dargestellt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock

Diagnose	Kriterien
SIRS (mindestens zwei Kriterien müssen erfüllt sein)	<ul style="list-style-type: none"> - Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$ - Herzfrequenz $>90/\text{Minute}$ - Atemfrequenz $>20/\text{Minute}$ oder $\text{P}_{\text{CO}_2} <32 \text{ mmHg}$ - Leukozyten $>12.000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$
Sepsis	SIRS + nachgewiesene Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis + mindestens ein Anzeichen für Organdysfunktion oder Organhypoperfusion <ul style="list-style-type: none"> - Organdysfunktion: z. B. nach SOFA-Score (Lopes Ferreira et al., 2001)
Septischer Schock	Schwere Sepsis + sepsis-induzierte Hypotension, die trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr besteht und nicht anderen Ursprungs ist

1.2. Die Immunpathogenese der Sepsis

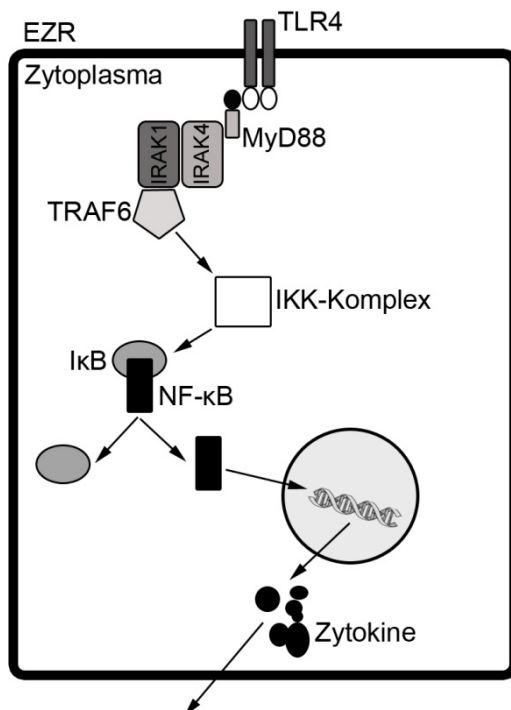


Abb. 1.1: Durch Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4) vermittelte Signalkaskade. Nach der Stimulation von TLR4 durch Lipopolysaccharide kommt es zur Anlagerung des Myeloid Differentiation Primary-Response Proteins 88 (MyD88) an den Rezeptor. MyD88 wiederum verbindet sich mit der IL-1-Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) 4. Es kommt zur Anlagerung und Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK4, wodurch TRAF6 aktiviert wird. Dies führt durch die Aktivierung des IκB Kinase (IKK) Komplexes zu einer Ablösung des NF-κB-Inhibitors IκB von NF-κB und nachfolgend zum Expressionsbeginn von Zytokinen, die in den Extrazellarraum (EZR) freigesetzt werden. Schema vereinfacht nach (Akira & Takeda, 2004).

Die immunpathologischen Vorgänge, die während einer Sepsis stattfinden, sind heute weitgehend geklärt. Wie schon in Kapitel 1.1 erwähnt, ist vor allem die überschießende Immunreaktion für das Fortschreiten der Sepsis bis hin zum septischen Schock verantwortlich. Der Beginn der Immunantwort liegt in der Erkennung des Pathogens durch die sogenannten „Toll-like Receptors“ (TLRs), von denen bei Säugetieren derzeit 13 verschiedene beschrieben sind und die ihren Namen dem zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Toll-Genes verdanken (Akira & Takeda, 2004; Buchholz & Bauer, 2010). In der vorliegenden Dissertation spielt vor allem der für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS; einem Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien) relevante TLR4 eine entscheidende Rolle. LPS komplexiert im Plasma mit dem LPS-bindenden Protein (LBP), bindet an den membranständigen CD14-Rezeptor (z. B. auf Makrophagen) und aktiviert so TLR4 (Devi Ramnath et al., 2006). TLR4 ändert dadurch seine Konformation und ermöglicht so die Anlagerung des Adaptermoleküls MyD88 („Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88“; Abb. 1.1). MyD88 wiederum bindet die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) 4 und

ermöglicht die Verbindung mit IRAK1, welches durch IRAK4 phosphoryliert wird. Dadurch kommt es zur Aktivierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktors 6 (TRAF6) und infolgedessen zur Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes

(IKK). Im Anschluss wird dadurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B („Nuclear Factor κ B“) von seinem Inhibitor I κ B befreit, was schließlich zu einer gesteigerten Expression von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren führt (Akira & Takeda, 2004). In der frühen Phase (30-90 Minuten) nach der Infektion kommt es zur extrazellulären Freisetzung der klassischen pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1). Diese lösen eine weitere Kaskade in der Bildung und Freisetzung von Zytokinen, Lipidmediatoren, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie der Hochregulierung von Zelladhäsionsmolekülen aus und induzieren damit die Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Gewebe (Dinarello, 1997; Tracey & Cerami, 1993). Des Weiteren steigern IL-1 und TNF- α die Transkription und Translation der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), ein Enzym, welches NO aus der Aminosäure L-Arginin generiert. Der dadurch bedingte hohe NO-Spiegel ist an der Ausprägung der Hypotonie, der myokardialen Dysfunktion, der Organschädigung und letztendlich dem multiplen Organversagen im septischen Schock mitverantwortlich (Thiemermann, 1997). Ein weiterer Aspekt ist die durch die erhöhten Zytokinkonzentrationen ausgelöste intravaskuläre Gerinnung. So kann LPS in Monozyten und Endothelzellen die Expression von Thromboplastin induzieren. Letztendlich führt dies zu einer erhöhten Fibrinbildung und somit zu einer Ablagerung von Fibrin vor allem in den kleineren Blutgefäßen. Auch dies begünstigt eine mangelhafte Gewebedurchblutung (Cohen, 2002; Esmon, 2005).

1.3. Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit als potenzielle Schutzstoffe gegen die Folgen eines lipopolysaccharid-induzierten Schocks

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, führt die durch den Blutdruckabfall und die abnorme Koagulation des Blutes verursachte Minderperfusion der verschiedenen Organe aufgrund einer Gewebeischämie zu Organschäden, die in einem multiplen Organversagen enden können. Somit ist die Gewebeischämie ein entscheidender pathogenetischer Faktor im durch LPS ausgelösten septischen Schock. Im Hinblick auf die LPS-induzierten pathophysiologischen Ereignisse, die letztendlich zur Gewebe- und Organschädigung führen, wäre es im Rahmen potenzieller Ansätze sehr erstrebenswert, sowohl die primäre Entzündungsreaktion zu reduzieren als auch vor den schädlichen Folgen einer daraus resultierenden Gewebeischämie zu schützen.

Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit haben bereits in zahlreichen Studien zur Protektion von Geweben vor einer Ischämie/Reperfusionsschädigung (I/R) ihre positive Wirkung unter Beweis gestellt. Für alle vier Substanzen wurden zudem anti-inflammatorische Eigenschaften in verschiedenen Endotoxämie-Modellen gezeigt.

1.3.1. Glycin

Die nicht essenzielle Aminosäure Glycin ist bekannt als inhibitorischer Neurotransmitter. Sie bindet in dieser Funktion an den Rezeptor eines ligandenabhängigen Ionenkanals und führt durch einen Chlorid-Einstrom zu einer Membranhypolarisierung und somit zu einer Inhibierung postsynaptischer Neuronen (Petrat et al., 2011a). Seit seiner Entdeckung 1987 als zytoprotektiver Wirkstoff (Weinberg et al., 1987) wurde Glycin bereits erfolgreich in zahlreichen Modellen der Ischämie/Reperfusion eingesetzt (Petrat et al., 2011b; Habib et al., 2006; Sheth et al., 2011). Ergänzend zu seinen zytoprotektiven Eigenschaften ist Glycin auch wegen seiner nachweislich immunomodulatorischen Wirkung in der Literatur beschrieben bzw. bereits in diversen Tiermodellen zur Endotoxämie erfolgreich eingesetzt worden (Bruck et al., 2003; Zhong et al., 2003; Xu et al., 2008). Allerdings sind die in der Literatur postulierten Wirkungsmechanismen nicht endgültig geklärt (Petrat et al., 2011a). Diskutiert wird, dass die zytoprotektive Eigenschaft von Glycin darauf beruht, die unter hypoxischen Bedingungen zunehmende Permeabilität der Plasmamembran zu vermindern (Venkatachalam et al., 1996; Nishimura & Lemasters, 2001). Die immunomodulatorische Eigenschaft der Aminosäure soll auf der Hemmung der Aktivierung von Kupfferzellen (Makrophagen in der Leber) beruhen. So konnte an Kupfferzellen von Ratten gezeigt werden, dass deren Aktivierung durch LPS mit Glycin gehemmt werden kann (Ikejima et al., 1997). Ähnlich wie in seiner Eigenschaft als inhibitorischer Neurotransmitter spielt bei dem hierbei zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus ein glycinabhängiger Chloridkanal in der Membran von Makrophagen und Neutrophilen die entscheidende Rolle. Durch die Depolarisierung der Membran wird ein Calcium-Influx und damit die Aktivierung der Makrophagen verhindert (Ikejima et al., 1997; Froh et al., 2002). Somit kann Glycin die Freisetzung bestimmter Zytokine durch Makrophagen eindämmen, indem es deren Aktivierung entgegenwirkt.

1.3.2. Pyruvat

Pyruvat ist nicht nur das Endprodukt der aeroben Glykolyse und damit ein wichtiges Intermediat des Metabolismus, sondern auch eine Substanz, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere H_2O_2 , neutralisieren kann. Dem liegt eine nichtenzymatische oxidative Decarboxylierungsreaktion zugrunde, die bereits vor mehr als hundert Jahren erstmals beschrieben worden ist (Kao & Fink, 2010; Holleman, 1904). Aber auch Hydroxyl-Radikale (OH^\bullet) und Peroxynitrit (ONOO^-) können durch Pyruvat neutralisiert werden (Ervens et al., 2003; Varma & Hegde, 2007). Aufgrund seiner Eigenschaften als Radikalfänger war es daher naheliegend, Pyruvat in diversen Schock- und Ischämie-/Reperusionsmodellen, in deren Pathogenese die Radikalbildung eine gewichtige Rolle spielt, einzusetzen. So konnte das therapeutische Potenzial von Pyruvat gegenüber Gewebeschädigungen in zahlreichen Publikationen zu den Themen Ischämie/Reperfusion (Petrat et al., 2011c; Sileri et al., 2001; Cicalese et al., 1999) oder hämorrhagischer Schock (Sharma & Mongan, 2010) gezeigt werden. Eine weitere in der Literatur diskutierte Eigenschaft von Pyruvat ist seine anti-inflammatorische Wirkung. Diese ist allerdings in erster Linie für Ethyl-Pyruvat – ein alipathischer Esther der Brenztraubensäure – beschrieben (Fink, 2008) und der zugrunde liegende Mechanismus nicht eindeutig geklärt. Postuliert werden vier unterschiedliche Hypothesen (Kao & Fink, 2010).

Eine Hypothese bezieht sich auf das Vorhandensein eines charakteristischen Motivs in Proteinen der NF- κ B-Familie, bestehend aus einem Cystein- und drei Arginin-Resten in der DNA-bindenden Region (Kefer et al., 2001; Kumar et al., 1992). Der Cysteinrest (Cys^{62}) ist essenziell für die Anbindung an die DNA, ist aber wegen der benachbarten, positiv geladenen Argininreste sehr oxidationsanfällig (Kumar et al., 1992). Ethyl-Pyruvat kann möglicherweise das intrazelluläre Redoxgleichgewicht in die oxidative Richtung verschieben und somit zur Oxidierung von Cys^{62} und dadurch zur Bindungsunfähigkeit des Transkriptionsfaktors NF- κ B beitragen (Kao & Fink, 2010).

Ein weiterer diskutierter anti-inflammatorischer Mechanismus beruht ebenfalls auf der Modifizierung eines Cysteinrestes (Cys^{38}) durch Ethyl-Pyruvat (García-Pineros et al., 2001) und wiederum soll die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA unterbunden werden. In diesem Falle aber ist die p65-Untereinheit von NF- κ B betroffen (Kao & Fink, 2010).

Die dritte Hypothese bezieht sich auf die Radikalfänger-Qualitäten von Ethyl-Pyruvat. In dieser Eigenschaft soll es die durch ROS induzierte Aktivierung der Januskinasen (JAK) und der STAT-Proteine („Signal Transducers and Activators of Transcription“), d. h. den JAK-STAT-Signalweg und die damit gekoppelte Zielgenexpression (iNOS, Zytokine etc.), unterbinden (Kao & Fink, 2010).

Eine vierte Hypothese bezüglich seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften beruht auf der Beobachtung, dass Ethyl-Pyruvat das Enzym Glyoxalase (Glo-1) hemmen kann, welches für den Abbau von Methylglyoxal (MGO) verantwortlich ist. MGO hemmt seinerseits mit steigender intrazellulärer Konzentration die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen (Kao & Fink, 2010).

Zwar beziehen sich diese vier postulierten anti-inflammatorischen Mechanismen auf Ethyl-Pyruvat, aber Wang *et al.* (2009) konnte zeigen, dass auch Natrium-Pyruvat in einem LPS-induzierten Modell der Gehirnentzündung entzündungshemmend wirkt (Wang *et al.*, 2009). So fanden die Autoren in mit Pyruvat behandelten Ratten signifikant niedrigere NF- κ B-Konzentrationen als in Tieren, die nur isotone Kochsalzlösung erhielten. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass auch Natrium-Pyruvat ein anti-inflammatorisches Potenzial besitzt.

1.3.3. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) ist ein polyphenoles Phytoalexin, welches in verschiedenen Pflanzen, besonders in roten Weintrauben, vorkommt und dort der Abwehr von Bakterien- und Pilzinfektionen dient (Shakibaei *et al.*, 2009). Seine mannigfaltigen biologischen Eigenschaften reichen von einer antikariogenen, anti-inflammatorischen und östrogenen Wirkung über eine kardiovaskuläre Protektion, Wirkung als Radikalfänger, Hemmung und Induktion der Apoptose (Shakibaei *et al.*, 2009) bis hin zur Inhibition der Thrombozytenaggregation (Wang *et al.*, 2002). Seine gewebeprotektiven Eigenschaften sind bereits in verschiedenen *in vivo*-Modellen, z. B. zur I/R der Leber (Gedik *et al.*, 2008), des Darms (Ozkan *et al.*, 2009; Petrat & de Groot, 2011) oder des Gehirns (Della Morte *et al.*, 2007), erfolgreich unter Beweis gestellt worden. Die postulierten Mechanismen, die Resveratrol in diversen Modellen und Krankheitsbildern so vorteilhafte Effekte verleihen, sind noch nicht hinreichend geklärt (Baur & Sinclair, 2006). Es existieren Arbeiten, die eine anti-inflammatorische Wirkung von Resveratrol nahelegen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass es die TNF-induzierte Aktivierung von NF- κ B blocken kann (Banerjee *et al.*, 2002;

Manna et al., 2000); der dahinter steckende Mechanismus bleibt allerdings weitgehend offen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die TNF-induzierte Phosphorylierung der genregulatorischen Untereinheit (p65) von NF- κ B durch Resveratrol unterbunden wird und damit auch die Expression NF- κ B-abhängiger Reportergene (Manna et al., 2000).

1.3.4. Nitrit

Nitrit (NO_2^-) ist normalerweise als ein unerwünschtes, potenziell kanzerogenes Abfallprodukt in der Nahrungskette bekannt (Lundberg et al., 2008) bzw. galt lange Zeit als physiologisch inertes Produkt des NO-Stoffwechsels (Dezfulian et al., 2007). Offenbar kann es aber unter bestimmten physiologischen Bedingungen wie der Hypoxie und Ischämie – also unter Sauerstoffmangel und niedrigem pH-Wert – als NO-Donor fungieren (Dezfulian et al., 2007; Van Faassen et al., 2009). Somit ist Nitrit ein NO-Reservoir und kann unter anderem durch Desoxyhämoglobin, Desoxymyoglobin, Xanthinoxidase und eine Protonierung zu biologisch aktivem NO reduziert werden (Lundberg et al., 2008). Dieser an hypoxische Areale gekoppelte Vorgang kann u. a. die Mikrozirkulation in den betroffenen Geweben verbessern, da das so entstandene NO vasodilatorische Eigenschaften besitzt. In diversen *in vivo*-Studien zu I/R verschiedener Organe – Niere (Tripatara et al., 2007), Leber (Lü et al., 2005; Duranski et al., 2005), Herz (Duranski et al., 2005) und Gehirn (Jung et al., 2006) – konnten bereits zytoprotektive Eigenschaften von Nitrit gezeigt werden. Der genaue, hinter der Zytoprotektion steckende Mechanismus ist nicht ganz geklärt. Wahrscheinlich ist die protektive Wirkung eng mit der NO-Bildung aus Nitrit verbunden, da in diversen *in vivo*-Versuchen ein Verlust der Protektion bei mit NO-Fängern behandelten Tieren festgestellt wurde (Lü et al., 2005; Duranski et al., 2005; Jung et al., 2006). Neben seinen NO-abhängigen Effekten kann Nitrit vermutlich auch den mitochondrialen Komplex I der Atmungskette während der I/R nitrosieren und damit die komplex-1-abhängige Bildung von ROS vermindern (Shiva et al., 2007). Abgesehen von seinem vasodilatorischen Effekt kann NO außerdem durch die Hemmung von NF- κ B (Connelly et al., 2001) auch einen Einfluss auf die Entzündungsreaktion haben, was eine Anwendung bei der Sepsis bzw. im septischen Schock nahelegt. So konnten z. B. Cauwels *et al.* bereits eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate bei mit einer letalen LPS-Dosis behandelten Mäusen durch die Injektion von Nitrit nachweisen (Cauwels et al., 2009).

1.4. Problemstellung und Ziele der Arbeit

Während einer Sepsis bzw. im septischen Schock kommt es sowohl aufgrund einer ischämischen Hypoxie als auch aufgrund einer überschießenden systemischen Inflammation zu Organ- und Gewebeschäden.

Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit sind in früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen bereits in zahlreichen experimentellen Modellen erfolgreich als Schutzstoffe gegen ischämische/hypoxische Schädigungen eingesetzt worden. Auch ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften wurden bereits häufig beschrieben. Die Effekte der Substanzen sind bislang jedoch noch nicht vergleichend in einem Tiermodell untersucht worden. Auch wurden bisher meist nur hohe Dosen eingesetzt. Unklar ist daher, ob und wie effektiv niedrige intravenöse Dosen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit vor den Folgen einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks schützen und ob potenzielle Schutzeffekte auf ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften oder einer direkten Protektion vor der hypoxischen Gewebeschädigung beruhen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Fragestellungen unter Verwendung eines Tiermodells beantwortet werden, das basierend auf einer intravenösen LPS-Injektion einen septischen Schock simuliert.

Zunächst sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Ratten ein Tiermodell etabliert werden, welches einen LPS-induzierten septischen Schock reproduzierbar simuliert. Dabei war eine tiefe Schockphase zu erreichen, ein vorzeitiges Ableben der Tiere innerhalb des relativ kurzen Versuchszeitraumes aber zu vermeiden, da protektive oder auch schädigende Effekte der Testsubstanzen bei einem zu schnellen und tiefen Schockzustand der Tiere nicht mehr untersucht werden können.

Nach der Etablierung des Modells sollte der Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierte Schädigung verschiedener Organe (Histologie, Markerenzymfreisetzung) und die Veränderung systemischer Parameter (Vitalparameter, Blutgasanalysen, Blutbild, Gerinnung) untersucht werden. Um der Fragestellung nachzugehen, ob Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit primär aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Eigenschaften wirken oder sie direkt vor der ischämischen Gewebeschädigung schützen, wurde ihr Einfluss auf die Einwanderung neutrophiler Granulozyten sowie die Zytokinfreisetzung in den verschiedenen Organen und ins Blutplasma untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Pharmaka, Materialien und Geräte

Tab. 2.2: Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Pharmaka, Materialien und Geräte

Hersteller	Substanz/Produkt
Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland	Forene®, Isofluran
Aldasorber®, Shirley Aldred, England	Cardiff Aldasorber (Aktivkohlefilter)
AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland	Xylocain 1 %
B. Braun AG, Melsungen, Deutschland	Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Perfusor®-Leitung Perfusor®-Spritze, 50 ml Perfusor® Secura FT
BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, USA	Microlance Kanülen, 0,6 mm x 30 mm
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Wasserstoffperoxid, 30 % HEPES Buffer-Grade Natriumchlorid
Ceva Tiergesundheit GmbH Düsseldorf, Deutschland	Ketamin, 10 %
DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland	ALAT (GPT) FS (IFCC mod.) ASAT (GOT) FS (IFCC mod.) CK-NAC FS Creatinine FS LDH FS IFCC
Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland	Trajan 808 Narkosegerät
Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	Freeflex®, Ringerlösung
Karl Beese GmbH, Barsbüttel, Deutschland	Bee Sana®, Vliesstoffkompressen
Leica, Wetzlar, Deutschland	Rotationsmikrotom RM2235
MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland	Wattestäbchen

Hersteller	Substanz/Produkt
Medax GmbH, Rendsburg, Deutschland	Heizplatte
Medex, Rossendale, England	MX960 Druckwandler
MediPlac® GmbH, Borchen, Deutschland	Druckmanschette
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Natriumnitrit, Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat
Midmark, Orchard Park, USA	Matrx Anesthetic Gas Scavenger
Radiometer GmbH, Willich, Deutschland	PICO50 Probennehmer mit 80 IU Elektrolyt-kompensiertem Heparin, ABL 715 Blutgasanalyse-Gerät
R-Biopharm AG, Darmstadt Deutschland	Nitrat Test-Kit
Resorba®, Nürnberg, Deutschland	Chirurgisches Nahtmaterial (Seide)
Retsch® GmbH, Haan, Deutschland	MM200 Schwingmühle
Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland	Complete® Proteaseinhibitor
Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland	Tube, 50 ml, Tube, 12 ml, Micro tube, 2 ml
Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland	Ministart Syringe Filter, 0,20 µm
Serva, Heidelberg, Deutschland	Glycine, analytical grade
Siemens, München, Deutschland	Sirecust 961 Biomonitor
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Lipopolysaccharide von <i>E. Coli</i> 0111:B4 LOT: 099K4025, Natrium-Pyruvat, Resveratrol, Formalin, 10 % neutral buffered, O-Dianisidin, Naphthylethyendiamin-Dichlorid, Sulfanilamid
Smith Medical GmbH, Grasbrunn, Deutschland	4-Wege Hähne, Poretex™ Polyäthylen-Schläuche, 0,58 mm ID, 0,96 mm OD
Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgien	Spritzen, 1 ml, 2 ml, 5 ml und 20 ml

Hersteller	Substanz/Produkt
Thermo Fisher Scientific®, Bonn Deutschland	Heraeus® Biofuge pico, Heraeus® Biofuge primo R
Varian, Darmstadt, Deutschland	Cary 100 Scan Spectrophotometer
Vital Scientific, Spankeren, Niederlande	Vitalab Selectra E

2.2. Die Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit männlichen Wistar-Ratten (WIS/WU) aus der Zucht des Zentralen Tierlabors am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Das Alter der Tiere lag zwischen 12 und 14 Wochen, das Körpergewicht zwischen 400 und 500 g.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach geltenden Tierschutzgesetzen unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), Luftfeuchtigkeit ($55\% \pm 5\%$) und zwölfstündigem Hell-/Dunkelrhythmus. Futter (ssniff®-Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden basierend auf der Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen: 87-51.04.2010.A047; TSG-Nr.: G 1108/10 des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) durchgeführt.

2.3. Das Tiermodell, Versuchsplanung und Serien im Überblick

Um die Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Natrium-Nitrit auf den Verlauf und die Auswirkungen eines akuten Endotoxinschocks möglichst reproduzierbar und weitgehend unter klinisch realistischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde zunächst ein entsprechendes Tiermodell mit Ratten etabliert. Die Induktion des Schocks erfolgte an narkotisierten Tieren durch einen intravenösen Bolus von Lipopolysacchariden (LPS). Systemische Parameter wie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die periphere Sauerstoffsättigung des Blutes (Pulsoxymetrie), die Körpertemperatur sowie die Herz- und Atemfrequenz wurden hierbei kontinuierlich überwacht. Diese Parameter, laborparametrische Untersuchungen aus intermittierenden Blutproben sowie finale Organentnahmen für eine histologische Aufarbeitung und der Gewinnung von Gewebehomogenaten für Messungen der Gewebeschädigung erlaubten eine umfassende Bewertung des Endotoxinschocks und der Einflüsse der eingesetzten Schutzstoffe.

Zur Etablierung des Tiermodells wurden in Vorversuchen (Serie 1) zunächst drei verschiedene LPS-Dosierungen (2,5; 5,0 und 7,5 mg/kg Körpergewicht (KGW)) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die systemischen Parameter untersucht. Danach folgten zwei weitere konsekutive Versuchsserien (Serie 2 und Serie 3), in denen weitere Schädigungsparameter untersucht und die Schutzstoffe Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit eingesetzt wurden. Diese beiden Serien unterschieden sich nicht in der Durchführung und dem zeitlichen Ablauf, sondern lediglich in der Größe der zu vergleichenden Versuchsgruppen (Serie 2, n=8/Gruppe; Serie 3, n=6/Gruppe) und in den gemessenen Parametern. In der Modelletablierungsserie waren die Zeitpunkte der Blutentnahmen von denen in Serie 3 abweichend (siehe Abb. 2.1; in Serie 2 nur finale Blutentnahme).

Die Versuchsabläufe im Überblick

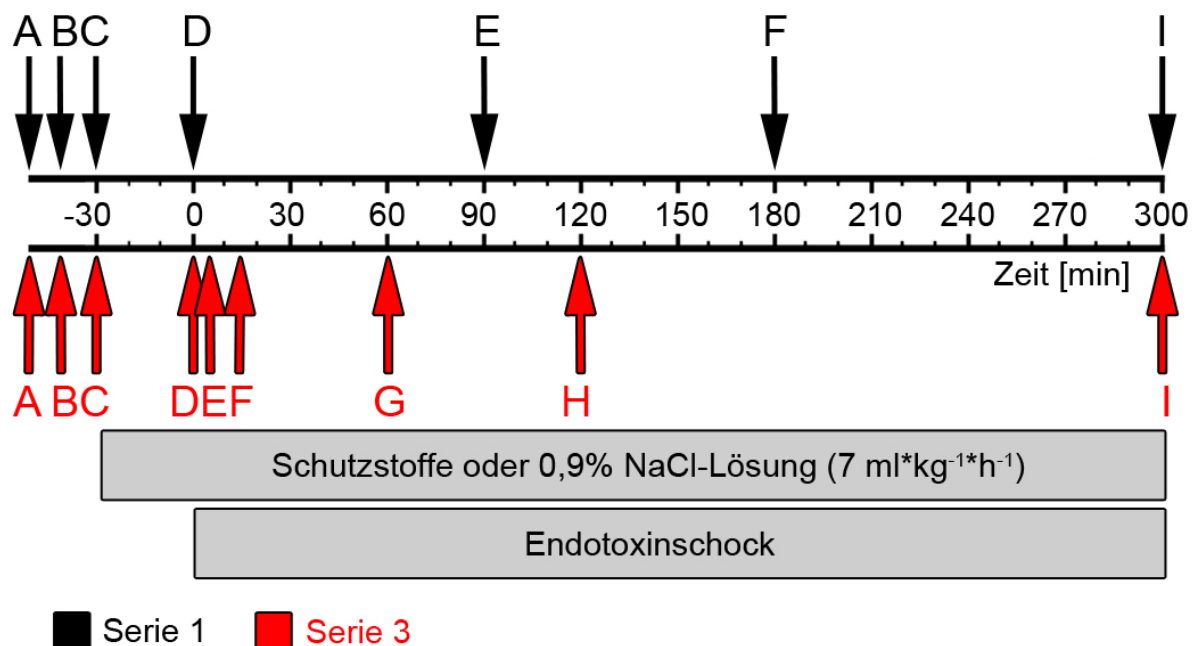


Abb. 2.1: Zeitlicher Ablauf der Versuchsserien 1 und 3. Gezeigt ist der zeitliche Ablauf der Versuchsserien 1 und 3 beginnend 30 Minuten vor der LPS-Gabe bis 300 Minuten danach. A: Vorlauf (Narkoseeinleitung, Katheterisierung *A. femoralis*); B: Beginn Biomonitoring, 1. Blutentnahme; C: Katheterisierung *V. femoralis*; D: 2. Blutentnahme, LPS-Gabe i.v.; E: 3. Blutentnahme; F: 4. Blutentnahme; G: 5. Blutentnahme; H: 6. Blutentnahme; I: Versuchsende (finale Blutentnahmen, Organentnahme). In Serie 2 war Ablauf von A-D identisch mit Serie 1 aber es erfolgte nur eine finale Blutentnahme.

In der 2. Serie lag der Fokus vor allem auf den finalen Parametern (am Ende des Versuchs) im Plasma (freies Hämoglobin, Nitrit + Nitrat-Gehalt als Maß für die NO-Bildung) und den Organen (histopathologische und makroskopische Veränderungen,

Einwanderung neutrophiler Granulozyten, organspezifische Zytokinkonzentrationen). In der 3. Serie wurde der Einfluss von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit sowohl auf die Zeitverläufe der Vitalparameter und Blutgasanalysen als auch auf die Verläufe der Aktivität von Markerenzymen sowie der Konzentration der Zytokine und des freien Hämoglobins (Hb) im Plasma untersucht. In der folgenden Abbildung (Abb. 2.1) sind die zeitlichen Abläufe in der Modelletablierungsserie und von der 3. Serie schematisch dargestellt.

2.4. Die Versuchsgruppen

In der folgenden Tabelle (Tab. 2.1) sind die Versuchsgruppen aller drei Serien charakterisiert. Die Größe der Gruppen in der Serie 1 und 3 lag bei jeweils n=6 Tieren, während in der 2. Serie n=8 Tiere pro Versuchsgruppe eingesetzt wurden.

Tab. 2.1: Charakterisierung der Versuchsgruppen aller Serien

Tab. 2.1: Charakterisierung der Versuchsgruppen aller Serien

Serie 1				
Gruppe	Perfusion mit:	LPS-Dosis	Anzahl Tiere	
NaCl-Kontrolle	0,9 % NaCl-Lösung	keine	6	
LPS 2,5 mg		2,5 mg/kg KGW	6	
LPS 5,0 mg		5,0 mg/kg KGW	6	
LPS 7,5 mg		7,5 mg/kg KGW	6	
Serien 2 und 3				
NaCl-Kontrolle	0,9 % NaCl-Lösung	keine	8 (6)	
LPS-Kontrolle		2,5 mg/kg KGW	8 (6)	
LPS + Glycin			20 mg/kg × h ⁻¹	8 (6)
LPS + Na-Pyruvat			50 mg/kg × h ⁻¹	8 (6)
LPS + Resveratrol			60 µg/kg × h ⁻¹	8 (6)
LPS + Na-Nitrit			40 µg/kg × h ⁻¹	8 (6)

Diese Tabelle zeigt die Einteilung der Versuchsgruppen der Serien 1 bis 3. In Serie 1 wurden alle Tiere mit 0,9 % NaCl-Lösung infundiert. Sie erhielten entweder kein LPS (NaCl-Kontrolle) oder 2,5; 5,0 oder 7,5 mg LPS/kg KGW i.v. Jede Gruppe in Serie 1 bestand aus n=6 Tieren. In den Serien 2 und 3 wurden die Kontrollgruppen (NaCl- und LPS-Kontrolle) nur mit 0,9 % NaCl-Lösung infundiert. Die Gruppen mit den Schutzstoffen wurden entweder mit Glycin (20 mg/kg \times h⁻¹), Natrium-Pyruvat (50 mg/kg \times h⁻¹), Resveratrol (60 μ g/kg \times h⁻¹) oder Natrium-Nitrit (40 μ g/kg \times h⁻¹) intravenös behandelt. Alle Gruppen (außer der NaCl-Kontrolle) der 2. und 3. Serie erhielten einen LPS-Bolus (2,5 mg/kg KGW). Jede Gruppe von Serie 2 bestand aus n=8 Tieren. In Serie 3 waren es jeweils n=6 Tiere pro Gruppe (Zahl in Klammern).

Das LPS (2,5; 5,0 oder 7,5 mg) wurde in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und anschließend sterilfiltriert (Minisart® 0,2 μ m; Sartorius, Göttingen, Deutschland). Die Versuchstiere bekamen 1 ml/kg KGW dieser Lösung innerhalb von 15 Sekunden

über die *Vena femoralis* appliziert; der dafür verwendete Katheter wurde unmittelbar danach mit 0,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Glycin (85,71 mg) sowie Natrium-Pyruvat (214,29 mg) wurden jeweils in 30 ml, Resveratrol (1,712 mg) in 200 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Danach wurde der pH-Wert der Lösungen mit NaOH bzw. HCl auf 7,35 eingestellt. Da Natrium-Nitrit bei niedrigen pH-Werten zerfällt, wurden 5 mg dieser Substanz zunächst in 50 ml einer leicht alkalischen 0,9 % NaCl-Lösung (pH 7,5-8,0) gelöst und anschließend 2 ml von dieser Stammlösung mit 33 ml 0,9 % NaCl-Lösung (pH 7,5-8,0) verdünnt. Alle derart angesetzten Schutzstoff-Lösungen wurden anschließend steril filtriert und mittels einer Perfusor-Pumpe (Perfusor® Secura FT; B. Braun, Melsungen, Deutschland) über die *Vena femoralis* infundiert.

2.5. Versuchsdurchführung

2.5.1. Anästhesie und Analgesie

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem Begasungstopf, der nach dem Einsetzen des Tieres mit Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) geflutet wurde (2 % Isofluran in 100 % Sauerstoff, 4 l/min). Nach Erreichen des gewünschten Narkosestadiums (Toleranzstadium nach Guedel (Guedel, 1937)) wurde die Ratte in Rückenlage auf eine Heizplatte (Medax GmbH, Rendsburg, Deutschland, 38°C-40°C) gelegt, um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern. Mittels einer Maske erhielten die Tiere weiterhin kontinuierlich Isofluran (1,2-2,0 % Isofluran in 100 % Sauerstoff, 1 l/min). Zur weiteren Analgesie erfolgte die subkutane Applikation von Ketamin (Ceva, Düsseldorf, 50 mg/kg KGW) in die rechte seitliche Brustwand sowie eine Lokalanästhesie in der rechten Leistenengegend durch die subkutane Applikation von Lidocain (AstraZeneca, Wedel, Deutschland, 5 mg/kg KGW).

2.5.2. Katheterisierung der Femoral-Gefäße

Nach Überprüfung der nötigen Narkosetiefe mittels des Zwischenzehen- und Corneareflexes erfolgte nach inguinaler Inzision die Präparation und Katheterisierung der rechten *Arteria femoralis* und *Vena femoralis*. Dabei wurden nacheinander beide Gefäße vorsichtig von umliegendem Gewebe separiert, auf einer Pinzette gelagert und distal ligiert bzw. proximal angeschlungen. Zuerst erfolgte das Einlegen des

Katheters (Poretex™ Polyäthylenschlauch; 0,58 mm ID, 0,96 mm OD; Smith Medical, Grasbrunn, Deutschland) in der Arterie, um möglichst rasch mit der Überwachung des Blutdrucks und den Blutentnahmen beginnen zu können. Dazu wurde das Gefäß mittels einer Gefäßschere angeschnitten, der Schnittrand mit Hilfe einer kleinen Pinzette festgehalten und der bereits luftblasenfrei gefüllte Schlauch (je nach Versuchsgruppe mit reiner 0,9%-NaCl-Lösung oder einer Schutzstofflösung) eingelegt. Dieser wurde bis zur Branche der Pinzette, auf der das Gefäß lagerte, vorgeschoben und mit der proximal liegenden Schlinge befestigt. Eine zusätzliche Fixierung mit Faden der distalen Ligatur war obligat. Anschließend wurde die zur Lagerung verwendete Pinzette wieder entfernt.

Analog dazu erfolgte danach die Katheterisierung der Vene. Über den Venen-Katheter wurden über die gesamte Versuchsdauer hinweg die jeweilige Schutzlösung oder isotonische Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung) mit einer Perfusionsrate von $7 \text{ ml/kg KGW} \times \text{h}^{-1}$ infundiert. Die Injektion des LPS-Bolus geschah exakt 30 Minuten nach Beginn der Perfusion mit dem jeweiligen Schutzstoff (oder der reinen 0,9%igen NaCl-Lösung) ebenfalls über diesen Katheter.

Nach Abschluss der Gefäßkatheterisierungen wurden die Tiere vom Hals abwärts mit Alufolie abgedeckt, um größerem Wärmeverlust entgegenzuwirken. Am Ende der Versuchszeit erfolgte die Tötung der Tiere unter tiefer Isofluran-Narkose durch Organentnahme.

2.5.3. Das Biomonitoring

Die Überwachung der Vitalparameter erfolgte kontinuierlich über den gesamten Versuchsverlauf und wurde alle zehn Minuten – bzw. alle fünf Minuten in den ersten 10 Minuten nach der LPS-Applikation – dokumentiert.

Der arterielle Blutdruck wurde über den Katheter in der *A. femoralis*, der mittels eines Druckwandlers (Medex™ MX960; Smith Medical, Grasbrunn, Deutschland) mit einem Patientenmonitor (Sirecust 961; Siemens, München, Deutschland) verbunden war, gemessen. Der Katheter wurde dabei mit Hilfe einer Druckmanschette (MediPlac, Borcheln, Deutschland) permanent mit Ringerlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) durchspült (3 ml/h). Anhand der Blutdruckkurve auf dem Monitor konnte außerdem die Herzfrequenz durch Abzählen der systolischen Blutdruck-Peaks ermittelt werden.

Durch Abzählen der Atemzüge innerhalb von fünfzehn Sekunden wurde die Atemfrequenz pro Minute bestimmt. Die Temperaturmessung erfolgte permanent mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde (Siemens, München Deutschland) und zur Überwachung der Sauerstoffsättigung war an der linken Hinterpfote ein Pulsoxymeter (OxiCliq A; Nellcor™, Boulder, USA) angebracht.

2.5.4. Blutgasanalysen und Plasmagewinnung

Über den Versuchszeitraum hinweg wurden zu bestimmten Zeitpunkten (Abb. 2.1) arterielle Blutproben von je 700 µl für die Erstellung von Blutgasanalysen (ABL 715; Radiometer, Willich, Deutschland) und zur Plasmagewinnung entnommen. Dazu fanden 2 ml Probennehmer (PICO50; Radiometer, Willich, Deutschland), die bereits mit 80 IU elektrolyt-kompensiertem Heparin bestückt waren, Verwendung.

Bei den Blutgasanalysen wurden neben den Partialdrücken von arteriellem Sauerstoff- (P_{O_2}) und Kohlendioxid (P_{CO_2}) auch die arterielle Sauerstoffsättigung, der pH-Wert, Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokrit und der Säure-Basen-Status (englisch „Base Excess“, BE) sowie das Standardbicarbonat ermittelt. Gleichzeitig erfolgte auch die Messung der Elektrolytkonzentrationen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) sowie der Konzentrationen der metabolischen Parameter Glukose und Laktat.

Nach der Blutgasanalyse wurde das verbleibende Blut in ein 1,5 ml Kunststoffreaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und 15 Minuten bei $3.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend konnte das überstehende Plasma vorsichtig abpipettiert und für die weiteren Messungen verwendet werden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung kühlgestellt oder – falls die Messung nicht am gleichen Tag erfolgte – bei $-80^\circ C$ eingefroren.

2.5.5. Bestimmung des freien Hämoglobins und Nitrit + Nitrat-Gehalts im Plasma

Als Nachweis einer wahrscheinlich auftretenden Hämolyse wurde der Hämoglobingehalt im Plasma anhand des Soret-Bande-Maximums bestimmt. Dazu wurden jeweils 20 µl Plasma mit 100 µl isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und die Absorption in Ultra-Mikro-Quarzküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) mit einem Spektrophotometer (Cary 100 Scan; Varian, Darmstadt, Deutschland) im Wellenlängenbereich von 400-475 nm gemessen. Der Hämoglobingehalt (in µmol/l) konnte anschließend aus dem Absorptionsmaximum – abzüglich der unspezifischen

Absorption bei 475 nm – nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wie folgt errechnet werden:

$$c(Hb)[\mu\text{mol/l}] = \frac{(Abs_{max} - Abs_{475})}{\varepsilon \times d} \times 10^6 \times VF$$

Abs_{max}: höchste gemessene Absorption Abs₄₇₅: Absorption bei 475 nm
 d: Schichtdicke (1 cm) VF: Verdünnungsfaktor
 ε: molarer Extinktionskoeffizient von Hämoglobin (131.000 x mol⁻¹ x cm⁻¹)

Als Maß für die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) ist die kumulative Konzentration von Nitrit und Nitrat im finalen Plasma, nach einem auf der Griess-Reaktion (Green et al., 1982) beruhenden Verfahren, gemessen worden. Das Nitrat wurde dabei vorab zu Nitrit reduziert. Für die Messung wurde ein kommerziell erhältlicher Nitrat-Test (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) mit kleineren Modifikationen eingesetzt. Für die Messung wurde das Plasma zunächst mittels Zentrifugal-Ultrafiltration (16.000 × g, 30 Minuten, 4°C) gereinigt. Hierbei sind zuvor mit *Aqua bidest* gespülte Filter (Vivaspin 500, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) eingesetzt worden. Nach der Filtration wurde der Test wie folgt durchgeführt:

100 µl Plasmafiltrat
 +100 µl Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)
 +100 µl Imidazol-Puffer (pH 7,8) mit NADPH 0,5 mg/ml und FAD 0,01 mg/ml (aus dem Kit)
 + 5 µl Nitrat-Reduktase (aus Kit)
 Inkubation bei Raumtemperatur (20 Minuten)
 + 5 µl Pyruvat-Lösung (12 mg/ml Natrium-Pyruvat in *Aqua bidest*)
 + 5 µl Laktat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim, Deutschland)
 Inkubation bei Raumtemperatur (20 Minuten)
 +750 µl Griess-Reagenz
 Inkubation bei Raumtemperatur (10 Minuten)
 Messung der Absorption bei 542 nm gegen Reagenzien-Leerwert ohne Plasma

Das für die Messungen benötigte Griess-Reagenz bestand zu gleichen Teilen aus 0,1 % Naphthylethylendiamin-Dichlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst in *Aqua bidest* sowie 1 % Sulfanilamid (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 5%iger Phosphorsäure, und wurde vor den Messungen frisch angesetzt. Die Berechnung der Nitrit-Konzentration in den Proben erfolgte dann anhand einer Standardkurve.

2.5.6. Bestimmung der Markerenzymaktivitäten und der Zytokinkonzentrationen im Plasma

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Laktat-Dehydrogenase (LDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Creatin-Kinase (CK-NAC) sowie der Kreatininkonzentration im Plasma erfolgte mit einem automatischen Analysesystem (Vitalab Selectra® E, Vital Scientific, Spankeren, Niederlande) mit entsprechenden Reagenzien-Kits der Firma DiaSys (Holzheim, Deutschland). Die Aktivität der pankreatischen Amylase (P-Amylase) wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen im Plasma der finalen Blutentnahme gemessen.

Für die Bestimmung der Zytokine Interleukin-1alpha (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF- α), des „Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) und von Interferon-gamma (IFN- γ) im Plasma wurden rattenspezifische Multi-Plex-ELISA (Bio-Plex Rat Cytokine, Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Das Plasma für diese Messungen war unmittelbar nach dessen Gewinnung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren worden. Die Messungen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen nach Herstellerangaben.

2.5.7. Blutbild und Gerinnung

Für die Erstellung eines Blutbilds mit Messungen der Thrombozyten-, Leukozyten- und Erythrozytenanzahl sowie des Hämoglobingehalts, Hämatokrits, des mittleren Erythrozytenvolumens (MCV), des mittleren Hämoglobingehalts pro Erythrozyten (MCH) und der mittleren Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyten (MCHC) wurde am Versuchsende – unmittelbar vor der Euthanasie des Tieres – eine 1,2 ml EDTA-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit Blut gefüllt.

Um eventuelle Veränderungen in der Gerinnungszeit des Blutes feststellen zu können, wurden der Quick-Wert und die „international normalized ratio“ (INR) gemessen. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls am Ende des Versuches eine 1,4 ml Citrat-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt. Die Messungen des Blutbildes und der Gerinnung erfolgten durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen.

2.5.8. Die organspezifischen Schädigungsparameter

2.5.8.1. Die Organentnahme

Am Ende eines jeden Versuches wurden den Tieren unter tiefer Narkose der Dünndarm, die Nieren, die Leber, das Herz und die Lunge entnommen. Zu diesem Zweck erfolgte eine mediane Laparotomie von 5-6 cm Länge entlang der *Linea alba*. Über diesen Schnitt konnten zunächst der Dünndarm und beide Nieren entnommen werden. Vor dem Entfernen der Leber wurde die Lunge über einen Luftröhrenschnitt mit Luft gefüllt, um einem Kollabieren des Organs durch Beschädigungen am Zwerchfell vorzubeugen. Dazu erfolgten eine mediane Halsinzision und anschließend die Präparation der Luftröhre. In die freigelegte Luftröhre wurde dann über einen kleinen Einschnitt ein Plastikschauch eingeführt und dieser mit einer Ligatur befestigt. Eine luftgefüllte 5 ml Spritze (Terumo Europe N. V., Leuven, Belgien) am anderen Ende des Schlauches wurde nun entleert und die Lunge so mit Luft gefüllt. Danach wurden die Leber, Lunge und das Herz im Ganzen entnommen.

2.5.8.2. Wiegen der Organe und Probenentnahme

Alle Organe wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme gewogen, um das Verhältnis von Organ- pro Kilogramm Körpergewicht berechnen zu können. Unmittelbar nach dem Wiegen wurde von jedem Organ eine kleine Probe (ca. <0,5 g) in eine separate 2 ml Mikro-Schraubröhre (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Im Falle des Dünndarms stammte diese Probe aus dem siebten Segment (siehe 2.5.8.4). Ein weiteres kleines Stück von jedem Organ, außer vom Herzen, wurde für die Herstellung von Homogenaten verwendet.

Von den beiden entnommenen Nieren wurde die rechte *in toto* für die histologische Aufarbeitung in 10%igem, neutral gepuffertem Formalin für mindestens 24 h fixiert. Analog dazu sind ein etwa 2 cm großes Stück (aus dem 7. Segment) des Dünndarms sowie ein Lappen der Leber, das Herz und die Lunge fixiert worden.

2.5.8.3. Bestimmung des Nass-Trockengewichts des Dünndarms

Um eine eventuell auftretende Ödembildung in der Dünndarmwand feststellen zu können, wurde ein etwa 2 cm langes Darmstück in einer kleinen Petrischale gewogen und anschließend für mindestens 48 Stunden bei 60°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurde erneut das Gewicht bestimmt und das Gewicht der Petrischale abgezogen.

Die Gewichtsveränderung des Dünndarmgewebes in Prozent wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Gewichtsveränderung [\%]} = 100 - \left(\frac{\text{Darm}_{\text{trocken}}}{\text{Darm}_{\text{nass}}} \times 100 \right) \times (-1)$$

2.5.8.4. Makroskopische Bewertung des Dünndarms

Der Dünndarm wurde in zehn gleich große Segmente aufgeteilt und diese beginnend beim Magen durchnummeriert. Für die histologische Aufarbeitung wurde vom siebten Segment ein etwa 2 cm großes Stück entfernt und in ein mit 10%iger, neutral gepufferter Formalinlösung (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefülltes 50 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die übrigen Darmsegmente wurden zur anschließenden Bewertung separat in Petri-Schalen auf Eis in Hepes/NaCl-Puffer (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,35) gelagert.

Zuvor wurde eventuell noch vorhandenes Mesenterium vorsichtig mit einer Pinzette von jedem der zehn Darmsegmente abgezupft und diese anschließend entlang der mesenterialen Linie mit einer Knopfschere aufgeschnitten. Dabei war der Darm möglichst permanent mit kaltem (4°C) HEPES/NaCl-Puffer bedeckt. Ingesta aus den aufgeschnittenen Segmenten wurde durch behutsames Schütteln im Puffer abgespült.

Um die makroskopische Bewertung der Darmsegmente zu erleichtern, sind diese auf einer Styropor-Platte mit Nadeln aufgespannt worden, wobei sie stets mit kaltem Puffer bedeckt waren. Jedes Segment wurde dann auf Petechien bzw. Hämorrhagien in der Darmwand hin untersucht und diese nach einem von Petrat et al. 2010 (Petrat et al., 2010) beschriebenen Score bewertet (Abb. 2.2). Dabei wurde festgehalten, welcher Score mit welchem prozentualen Flächenanteil auf jedem der zehn Segmente vorkam. Daraus wurde dann der mittlere Score für jedes Segment gebildet.

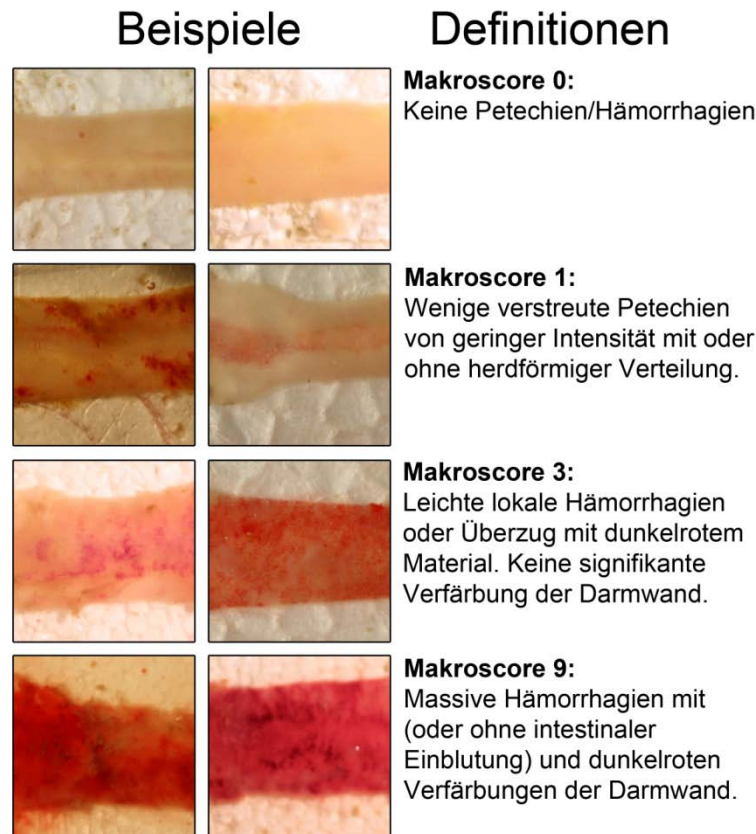


Abb. 2.2: Definition des Makroscores (nach Petrat et al. 2010 (Petrat et al., 2010))

Gezeigt sind jeweils zwei Beispiele für jeden Makroscore (0, 1, 3 und 9). Der Score ist nicht linear, sondern entsprechend dem Blutgehalt des Gewebes exponentiell aufgebaut. Ein Darmstück mit starker Schädigung wird mit 9 Punkten gewertet, eines mit mittlerer Schädigung erhält 3 Punkte, im Falle einer leichten Schädigung wird 1 Punkt vergeben und 0 Punkte entsprechen einem Darmstück ohne Schädigung.

2.5.8.5. Gewinnung der Organhomogenate und Homogenatüberstände

Zur Gewinnung der Homogenate des Dünndarms, der Niere, der Leber und der Lunge wurde eine kleine repräsentative Probe von jedem Organ (außer vom Dünndarm) in ein separates 2 ml Kunststoffreaktionsgefäß mit jeweils 1 ml kaltem (4°C) HEPES/NaCl-Puffer (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,35) inklusive Complete® Proteaseinhibitor (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland; 1 Tablette je 50 ml Puffer) gegeben. Der gesamte Dünndarm wurde auf insgesamt 20 der so präparierten Gefäße aufgeteilt. Danach wurden die jeweiligen Gefäße mit den Proben von der Niere, Leber sowie der Lungen gewogen und das Leergewicht (Gefäß inklusive 1 ml Puffer) abgezogen, um das Gewicht der Organprobe zu bestimmen. Mit einer dünnen Schere erfolgte nun zunächst eine grobe Zerkleinerung der Organe, anschließend wurden die Proben in einer Schwingmühle (MM200,

Retsch, Haan, Deutschland) für 15 Minuten bei maximaler Schwingung (30/s) homogenisiert.

Das Homogenat des Dünndarms aus den 20 Gefäßen wurde zunächst in einem 50 ml Röhrchen vereint und so die Gesamthomogenatmenge erfasst. Anschließend wurde das Homogenat wiederum auf 20 neue 2 ml Reaktionsgefäße für die Zentrifugation aufgeteilt. Ebenso wurden die Homogenate von der Niere, der Leber und der Lunge jeweils in neue 2 ml Gefäße pipettiert. Alle Homogenate wurden dann abzentrifugiert (15 Minuten, $16.000 \times g$, 4°C) und im Anschluss daran die Überstände für die weiteren Untersuchungen vorsichtig in neue 1,5 ml Gefäße (bzw. 50 ml Gefäß im Falle des Dünndarms) pipettiert.

2.5.8.6. Hämoglobinkonzentration und Myeloperoxidaseaktivität in den Homogenatüberständen der Organe

Die Hämoglobinkonzentration in den Homogenatüberständen des Dünndarms, der Niere, der Leber und der Lunge wurde anhand des Soret-Bande-Maximums, wie schon in Kapitel 2.5.5. beschrieben, bestimmt. Die gemessene Hämoglobinkonzentration wurde anschließend auf das Gewicht der Gewebewinwaage bezogen, um die Hb-Menge (in μmol) pro Gramm Gewebe zu ermitteln.

Am Selectra E wurde die Myeloperoxidaseaktivität [U/l] in den verschiedenen Homogenatüberständen gemessen. Dabei wurde nach der bereits 1982 von Bradley et al. (Bradley et al., 1982) beschriebenen Methode, mit kleineren Veränderungen, vorgegangen. So musste die Wellenlänge, bei der die Messungen stattfanden, gerätebedingt auf 436 nm (anstatt 460 nm) geändert werden. Es fand jeweils eine Doppelbestimmung statt, woraus dann der Mittelwert gebildet wurde. Dieser wurde anschließend auf die Gewebewinwaage bezogen, um die MPO-Aktivität je Gramm Einwaage zu ermitteln.

2.5.8.7. Zytokinmessungen in den verschiedenen Organen

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ und TNF- α im Gewebe der Niere, der Leber, der Lunge, des Herzens und des siebten Dünndarmsegments wurde jeweils eine kleine repräsentative Probe im Zuge der Organentnahme am Versuchsende entnommen

und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Organproben wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung eines handelsüblichen Kits (Bio-Plex™ Cell Lysis Kit, Bio-Rad, München, Deutschland) lysiert. Vor der eigentlichen Zytokinmessung in den Gewebelysaten erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen für jede Probe eine Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (Bradford, 1976). Für die Messung der Zytokine wurde dann jeweils eine Gesamtproteinkonzentration von 125 µg/ml eingesetzt. Die Messungen erfolgten ebenfalls unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Bio-Plex Rat Cytokine, Bio-Rad, München, Deutschland) im Zentrallabor.

2.6. Histologie

Am Ende der Versuche wurde den Tieren die rechte Niere, die Leber, die Lunge, das Herz und der Dünndarm – wie in 2.5.8.1. beschrieben – entnommen und für mindestens 24 Stunden im zwanzigfachen Volumen neutral gepufferten, 10%igem Formalin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) fixiert. Im Falle des Dünndarms wurde ein etwa 2 cm großes Stück aus dem siebten Darmsegment (siehe 2.5.8.4.) für die Histologie verwendet. Die Lunge wurde zuvor mit 5 ml Formalin gefüllt, um eine vollständige Entfaltung des Organs zu gewährleisten. Die Organproben wurden nach der Entwässerung in Paraffin eingebettet und an einem Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar, Deutschland) zu Dünnschnitten (2 µm) verarbeitet.

2.6.1. Färbung der histologischen Schnitte

Die histologischen Schnitte wurden mittels zwei unterschiedlichen Methoden gefärbt. Sie wurden entweder einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) als oder einer Naphthol AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung (CE-Färbung) unterzogen. Die CE-Färbung diente der Kenntlichmachung neutrophiler Granulozyten und erfolgte nach Herstellerangaben mit einem handelsüblichen Kit (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) nach vorheriger Entparaffinierung der Schnitte mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe.

Die HE-Färbung erfolgte maschinell am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Essen.

2.6.2. Histologische Befundung der Organe

Dünndarm

Die HE-gefärbten Schnitte des Dünndarms wurden lichtmikroskopisch ($V=100\times$) auf einer Skala von 0 bis 8, basierend auf einem modifizierten Score nach Park und Chiu (Chiu et al., 1970; Park et al., 1990), wie folgt bewertet: 0 = normale Mukosa; 1 = subepithelialer Grünhagen-Raum und verstopfte Kapillaren; 2 = Ausdehnung des subepithelialen Raumes mit mäßiger Ablösung des Epithels; 3 = starke Ablösung des Epithels der Villi, einige Spitzen freiliegend; 4 = freiliegende „nackte“ Villi; 5 = zerstörte Villi und Hämorrhagien; 6 = beschädigte Krypten; 7 = Nekrose der gesamten Mukosa und Submukosa, Hämorrhagien; 8 = transmurale Nekrose, Hämorrhagien.

Das Auszählen der neutrophilen Granulozyten auf den CE-gefärbten Schnitten erfolgte am Lichtmikroskop unter 400facher Vergrößerung. Dabei wurden pro Tier sechs randomisierte Gesichtsfelder ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

Niere

Unter dem Lichtmikroskop wurden die mit HE gefärbten Schnitte der Niere nach folgenden Parametern beurteilt. Der prozentuale Anteil der gesamten Fläche von innerer und äußerer Medulla sowie des Cortex, der mit Erythrozyten versehen war, wurde bestimmt ($V=400\times$). Außerdem wurde der Prozentsatz der atrophischen Glomeruli und der Glomeruli, die mehr als 20 Erythrozyten enthielten, ermittelt ($V=400\times$). Als ein weiterer Parameter diente der prozentuale Anteil der von der Basalmembran gelösten Tubuli der inneren und äußeren Medulla sowie des Cortex an der Gesamtfläche ($V=100\times$).

Das Auszählen der neutrophilen Granulozyten auf den CE-gefärbten Schnitten erfolgte bei 100facher Vergrößerung. Dabei wurden insgesamt sechs randomisierte Gesichtsfelder pro Tier ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Leber

Mit HE gefärbte Leberschnitte wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl von Erythrozyten innerhalb der Sinusoide pro Gesichtsfeld ($n=15$) bewertet ($V=100\times$). Ebenso der prozentuale Anteil der Fläche des Leberparenchyms, in das Granulozyten eingewandert waren, wurde pro Gesichtsfeld ($n=20$) ausgewertet ($V=400\times$). Des Weiteren erfolgte die Bewertung des Zustands

der Lebervenen. Dabei wurde der gesamte Schnitt betrachtet und die Venen nach „blutleer“, „blutgefüllt“ oder „mit Gerinnseln verstopft“ eingeteilt und anschließend bestimmt, welchen prozentualen Anteil jeder Status ausmachte ($V=100\times$). Als weiterer Parameter diente die durchschnittliche Anzahl, Lage (nahe an Gefäßen oder im Parenchym) und Größe (klein, groß, gemischt) cytosolischer Vakuolen in den Hepatozyten ($V=400\times$).

Die Auszählung der neutrophilen Granulozyten erfolgte bei 400facher Vergrößerung. Dabei wurden jeweils sechs randomisierte Gesichtsfelder der mit CE gefärbten Schnitte ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Lunge und Herz

Die histologische Befundung der HE-gefärbten Schnitte der Lunge und des Herzens erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Beide Organe wurden nach Ödemen abgesucht und deren Anteil an der Gesamtfläche bestimmt ($V=200\times$). Am Herzen wurden zudem die myokardialen Fasern auf Veränderungen bzw. Nekrosen hin untersucht.

Die Auszählung der neutrophilen Granulozyten der mit CE gefärbten Schnitten erfolgte bei 400facher Vergrößerung. Es wurden jeweils sechs randomisierte Gesichtsfelder pro Schnitt ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Modelletablierungsserie (Serie 1)

3.1.1. Effekte von Lipopolysacchariden auf den Blutdruck und andere Vitalparameter der Ratte

Bei der Auswertung der Modelletablierungsserie zur LPS-Dosisfindung (Serie 1) zeigten sich bei den Vitalparametern keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den drei getesteten Dosierungen (Abb. 3.1).

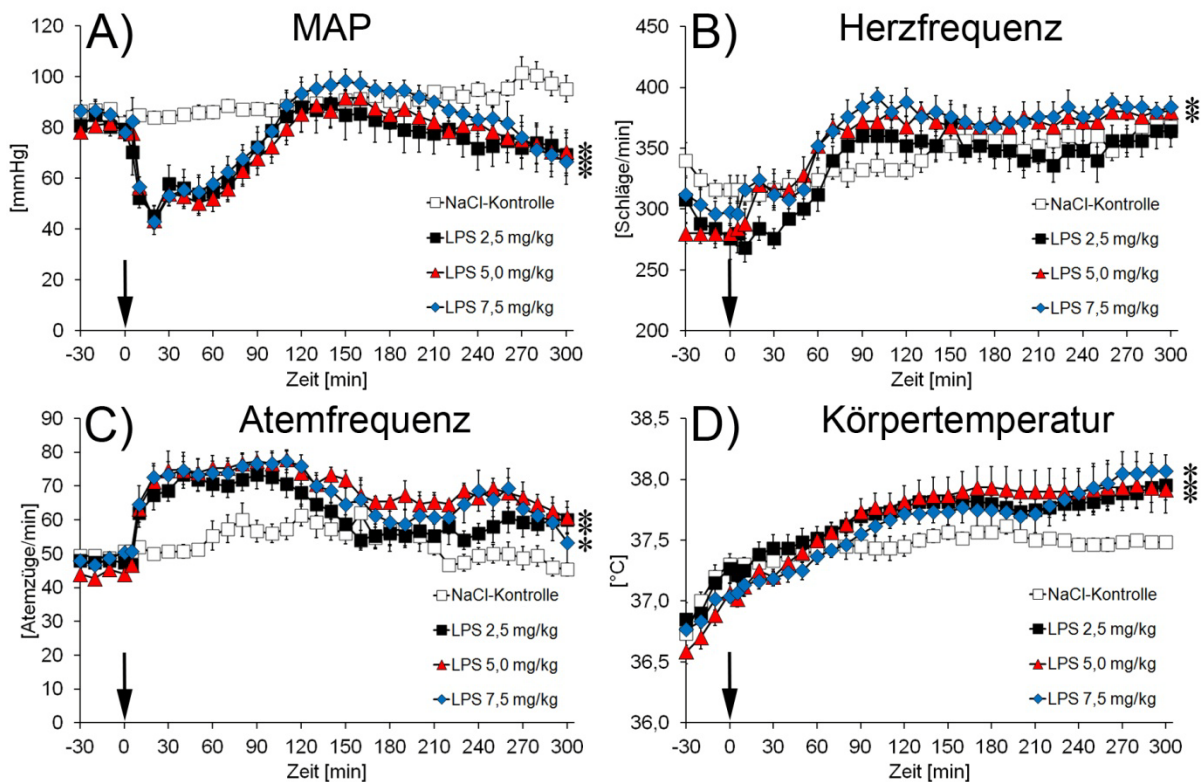


Abb. 3.1: Effekte der verschiedenen LPS-Dosierungen auf die Vitalparameter der Ratte. Die narkotisierten und analgesiierten Tiere wurden kontinuierlich mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten vor der intravenösen LPS-Injektion (2,5, 5,0 oder 7,5 mg/kg, Pfeile). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS, aber das gleiche Volumen 0,9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Dargestellt sind der mittlere arterielle Blutdruck (MAP, A), die Herzfrequenz (B), die Atemfrequenz (C) und die Körpertemperatur (D). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$. Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. * $p < 0,05$ (gegenüber NaCl-Kontrolle für den gesamten Zeitraum nach LPS-Injektion).

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in der NaCl-Kontrollgruppe blieb während des gesamten Versuchszeitraums weitgehend konstant zwischen $81,8 \pm 2,9$ mmHg und $101,4 \pm 6,4$ mmHg (Abb. 3.1A). Bei den mit LPS behandelten Tieren kam es innerhalb von 20 Minuten nach dessen Injektion zu einem signifikanten Abfall des MAP. Der niedrigste MAP wurde in allen drei LPS-Gruppen nach 20 Minuten gemessen und lag bei $45,2 \pm 4,0$ mmHg in der mit 2,5 mg LPS/kg behandelten Gruppe und bei $43,4 \pm 5,6$ bzw. $43,1 \pm 3,1$ mmHg in den Gruppen mit 5,0 und 7,5 mg LPS/kg. Anschließend stieg der MAP in allen drei Gruppen langsam aber stetig an, um nach 120 Minuten wieder das Level der Kontrollgruppe zu erreichen. Im späteren Versuchsverlauf fiel der MAP der mit LPS behandelten Gruppen, unabhängig von der Höhe der LPS-Dosis, wieder langsam ab. Am Versuchsende, 300 Minuten nach der LPS-Applikation, lagen die Blutdrücke der drei LPS-Gruppen mit $69,4 \pm 8,3$ mmHg (2,5 mg LPS/kg), $70,4 \pm 8,6$ mmHg (5,0 mg LPS/kg) und $66,7 \pm 9,1$ mmHg (7,5 mg LPS/kg) signifikant unter dem Wert der NaCl-Kontrolle ($95,2 \pm 5,2$ mmHg).

Im Falle der Herzfrequenz streuten die Werte der Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer Ausgangswerte zufallsbedingt relativ weit (Abb. 3.1B). Grundsätzlich war bereits 60 Minuten nach der LPS-Applikation die Herzfrequenz unabhängig von der Dosierung erhöht. Im gesamten Versuchsverlauf nach der Gabe von LPS zeigten nur die mit 5,0 bzw. 7,5 mg/kg behandelten Tiere eine signifikant erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zur NaCl-Kontrolle.

Die Atemfrequenz betrug zu Beginn bei allen Versuchsgruppen ca. 45 Atemzüge pro Minute (Abb. 3.1C). In der NaCl-Kontrollgruppe blieb die Atemfrequenz über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant bei diesem Wert (45 ± 2 - 62 ± 10 Atemzüge/Minute). Die Applikation von LPS bewirkte, unabhängig von der Dosis, innerhalb weniger Minuten einen deutlichen Anstieg der Atemfrequenz auf 73 ± 4 (2,5 mg LPS/kg), 78 ± 2 (5,0 mg LPS/kg) bzw. 77 ± 3 (7,5 mg LPS/kg) Atemzüge pro Minute. In den beiden höher dosierten LPS-Gruppen blieb die Atemfrequenz über den gesamten Zeitraum nach der LPS-Applikation, im Vergleich zur NaCl-Kontrolle, signifikant erhöht. Dies war für Tiere, die nur 2,5 mg LPS/kg erhielten, zwischen 140 und 160 Minuten nach der LPS-Gabe nicht der Fall. Eine ANOVA mit wiederholten Messungen ergab, bezogen auf den gesamten Beobachtungszeitraum nach der LPS-Gabe, für alle drei LPS-Dosen einen signifikanten Unterschied zur NaCl-Kontrolle.

Alle LPS-Dosen bewirkten einen signifikanten Anstieg der Körpertemperatur im Zeitraum nach der LPS-Injektion (Abb. 3.1D). Während in Tieren der NaCl-Kontrollgruppe die Temperatur über den gesamten Versuchszeitraum zwischen $36,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$ und $37,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ lag, stieg die Körpertemperatur aller mit LPS behandelten Tiere auf etwa 38°C an und war damit, bezogen auf den gesamten Zeitraum ab der LPS-Gabe, signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

3.1.2. Effekte von Lipopolysacchariden auf die Markerenzymaktivitäten sowie die Kreatinin- und Hämoglobinkonzentration im Plasma

Die Messung der Enzymaktivitäten der Laktat-Dehydrogenase (LDH), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bzw. der Kreatininkonzentration im Plasma der NaCl-Kontrollgruppe ergab keine signifikante Veränderung in diesen Parametern über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 3.2).

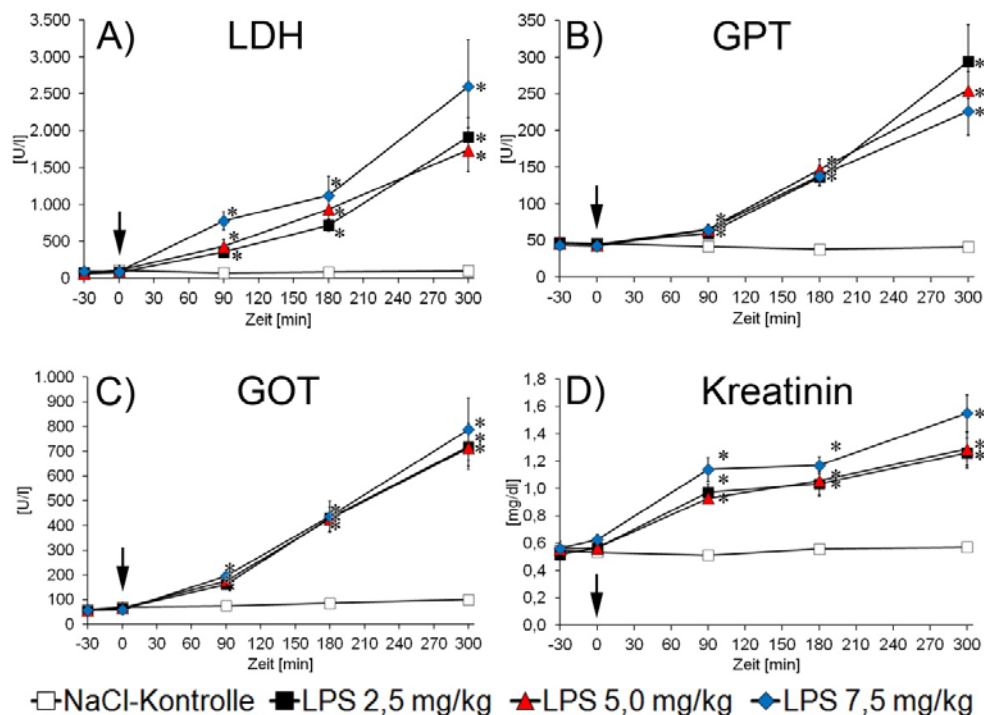


Abb. 3.2: Effekte der verschiedenen LPS-Dosierungen auf die Aktivitäten der Plasmaenzyme Laktat-Dehydrogenase (LDH, A), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, B) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, C) sowie auf die Kreatininkonzentration (D) im Blutplasma. Die Ratten wurden kontinuierlich mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten vor der LPS-Injektion (2,5, 5,0 oder 7,5 mg/kg, Pfeile). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS, wurden aber mit dem gleichen Volumen 0,9%iger NaCl-Lösung behandelt (1 ml/kg als Bolus). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$. Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. * $p < 0,05$ (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Die Applikation von LPS bewirkte bereits nach 90 Minuten einen signifikanten Anstieg aller Parameter, die sich stetig bis zum Versuchsende nach 300 Minuten erhöhten (Abb. 3.2A-D). Die LDH-Aktivität, ein genereller Marker der Zellschädigung, stieg in der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum lediglich von etwa 75 auf 105 U/l an (Abb. 3.2A). Die Applikation von LPS bewirkte im Verlauf von 90 Minuten einen starken Anstieg der LDH-Aktivität auf 358 ± 30 U/l (2,5 mg LPS/kg), 453 ± 85 U/l (5,0 mg LPS/kg) bzw. auf 779 ± 123 U/l infolge der höchsten LPS-Dosis. In den mit 7,5 mg LPS/kg LPS behandelten Tieren erfolgte zwar ein etwas stärkerer Anstieg als bei den beiden niedrigeren LPS-Dosierungen, die Unterschiede waren

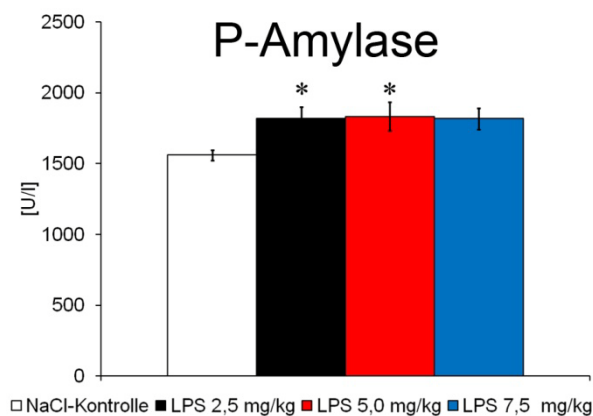


Abb. 3.3: Effekt von intravenös appliziertem LPS auf die Pankreas-Amylase-Aktivität im Plasma der finalen Blutentnahme. Die Ratten wurden kontinuierlich mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert (7 ml/kg \times h), beginnend 30 Minuten vor der LPS-Injektion (2,5, 5,0 oder 7,5 mg/kg). Tiere der Kontroll-Gruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS aber wurden mit dem gleichen Volumen 0,9 % NaCl-Lösung behandelt (1 ml/kg). Die Blutentnahme erfolgte 300 Minuten nach den LPS-Gaben (Versuchsende). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM, n=6.

aber nur zu dem Zeitpunkt 90 Minuten nach der LPS-Gabe signifikant. Auch die Aktivität der Transaminasen im Plasma, die ein Maß für die Leberschädigung sind, blieb in der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant niedrig (GPT: 38 ± 3 - 47 ± 3 U/l; GOT: 60 ± 4 - 100 ± 10 U/l; Abb. 3.2B, C). Nach der LPS-Applikation, gleich welcher Dosis, nahm sowohl die GPT- als auch die GOT-Aktivität im weiteren Zeitverlauf stark zu. Die drei verschiedenen LPS-Dosen unterschieden sich dabei aber nicht signifikant voneinander.

Die Kreatininkonzentration im Plasma der NaCl-Kontrollgruppe lag während des gesamten Versuchszeitraumes bei ca. 0,5 mg/dl (Abb. 3.2D) und zeigte somit eine uneingeschränkte Nierenfunktion an.

Die LPS-Injektionen bewirkten bereits im Verlauf von 90 Minuten einen signifikanten Anstieg der Kreatininkonzentration auf $0,97 \pm 0,06$ mg/dl (2,5 mg LPS/kg), $0,93 \pm 0,04$ mg/dl (5,0 mg LPS/kg) und $1,14 \pm 0,22$ mg/dl (7,5 mg LPS/kg), die untereinander nicht signifikant verschieden waren. Bis zum Versuchsende nach 300 Minuten hatte sich die Kreatininkonzentration in allen LPS-Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert mehr als verdoppelt. In den mit 7,5 mg LPS/kg behandelten Ratten

kam es zwar insgesamt zu einem stärkeren Anstieg der Kreatininkonzentration als durch die beiden niedrigeren Dosierungen, aber dieser Effekt war nicht statistisch signifikant. Die Pankreas-Amylase-Aktivität (P-Amylase) im Plasma der finalen Blutentnahme (300 Minuten nach LPS-Gabe) war in der 2,5 mg LPS- und in der 5,0 mg LPS-Gruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe (1.560 ± 40 U/l) signifikant erhöht (1.817 ± 82 U/l bzw. 1.833 ± 101 U/l), was auf eine Schädigung der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) hindeutete (Abb. 3.3). Nicht statistisch signifikant war der Anstieg auf 1.817 ± 83 U/l in den mit 7,5 mg LPS/kg behandelten Tieren.

Die Konzentration des freien Hämoglobins im Plasma der finalen Blutentnahme (ohne Abbildung) war in den drei LPS-Gruppen um mehr als das Zehnfache erhöht (NaCl-Kontrolle: $2,4 \pm 0,1$ μ M; 2,5 mg LPS/kg: $29,4 \pm 5,9$ μ M; 5,0 mg LPS/kg: $26,1 \pm 2,3$ bzw. 7,5 mg LPS/kg: $31,9 \pm 2,4$ μ M). Alle drei LPS-Dosierungen bewirkten somit signifikant erhöhte Hämolyseraten, unterschieden sich dabei aber nicht signifikant voneinander.

3.1.3. Effekte von Lipopolysacchariden auf Parameter der Blutgasanalyse, metabolische Parameter, Elektrolyte sowie den Hämoglobingehalt und Hämatokrit

Die intravenöse Injektion von LPS führte unabhängig von der Dosis bereits im Verlauf von 90 Minuten zu einem signifikant erniedrigten pH-Wert des Blutes im Vergleich zur NaCl-Kontrolle (NaCl-Kontrolle: $7,30 \pm 0,02$; 2,5 mg LPS/kg: $7,25 \pm 0,01$; 5,0 mg LPS/kg: $7,22 \pm 0,03$ und 7,5 mg LPS/kg: $7,23 \pm 0,01$; Tab. 3.1). Zum Versuchsende nach 300 Minuten näherten sich die drei LPS-Gruppen wieder dem pH-Wert der Kontrollgruppe an; lediglich in der Gruppe mit der höchsten LPS-Dosis (7,5 mg/kg) blieb der pH-Wert signifikant erniedrigt. Der Kohlendioxid-Partialdruck (P_{CO_2}) des Blutes wurde nur temporär, nach 90 Minuten, durch die höchste LPS-Dosis signifikant vermindert (Tab. 3.1). Im Gegensatz dazu wurde der arterielle Sauerstoffpartialdruck (P_{O_2}) durch alle drei LPS-Dosen über die gesamte Versuchszeit signifikant erniedrigt. Die niedrigsten Werte wurden 90 Minuten nach der LPS-Injektion gemessen (NaCl-Kontrolle: 483 ± 25 mmHg; 2,5 mg LPS/kg: 138 ± 16 mmHg; 5,0 mg LPS/kg: 144 ± 19 mmHg bzw. 7,5 mg LPS/kg: 110 ± 10 mmHg). Auch die arterielle Sauerstoffsättigung des Blutes war in allen mit LPS behandelten Tieren deutlich vermindert, statistisch signifikant zur NaCl-Kontrolle allerdings nur nach Applikation der höchsten LPS-Dosis, wo nach 90 Minuten

lediglich eine Sättigung von 90,8 % bzw. von 94,6 % nach 180 Minuten gemessen wurden. Die in der 7,5 mg LPS-Gruppe gemessenen Werte waren auch signifikant niedriger als die Sauerstoffsättigung in den beiden geringer dosierten LPS-Gruppen. Der Basenüberschuss (englisch „Base Excess“, BE) fiel bei den Tieren der NaCl-Kontrolle über den Versuchszeitraum von $3,6 \pm 0,2$ mmol/l auf $-1,3 \pm 0,6$ mmol/l ab und blieb somit innerhalb der physiologischen Spanne von $\pm 2,0$ mmol/l. In allen mit LPS behandelten Ratten fiel der BE nahezu dosisunabhängig signifikant stärker ab und lag am Versuchende bei $-9,1 \pm 0,2$ mmol/l (2,5 mg LPS/kg), $-9,7 \pm 0,2$ mmol/l (5,0 mg LPS/kg) bzw. $-11,3 \pm 1,1$ mmol/l (7,5 mg LPS/kg, Tab. 3.1). Zu signifikanten Unterschieden im BE zwischen den drei LPS-Gruppen kam es lediglich infolge der niedrigsten (2,5 mg/kg) und der höchsten (7,5 mg/kg) LPS-Dosierung 180 und 300 Minuten nach ihrer Applikation. Analog dazu fiel auch die Konzentration des Standardbikarbonats bereits 90 Minuten nach der LPS-Gabe (unabhängig von der Dosis) signifikant im Vergleich zur NaCl-Kontrolle ab (NaCl-Kontrolle: $23,8 \pm 0,5$ mmol/l; 2,5 mg LPS/kg: $18,1 \pm 0,5$ mmol/l; 5,0 und 7,5 mg LPS/kg: $17,3 \pm 0,6$ mmol/l). Wie auch der BE erniedrigte sich die Konzentration des Standardbikarbonats mit fortschreitender Versuchszeit zunehmend.

Die Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Kalium (K^+), Natrium (Na^+), Calcium (Ca^{2+}) und Chlorid (Cl^-) zeigten über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Veränderungen in den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe (Tab. 3.1). Die Applikation von LPS führte dosisunabhängig in allen vier Parametern zu signifikanten Veränderungen. So stieg die K^+ -Konzentration ab 180 Minuten in allen mit LPS behandelten Gruppen signifikant im Vergleich zur NaCl-Kontrolle von $4,46 \pm 0,04$ auf $5,42 \pm 0,17$ mmol/l (2,5 mg LPS/kg), $5,64 \pm 0,16$ mmol/l (5,0 mg LPS/kg) bzw. $5,33 \pm 0,16$ mmol/l (7,5 mg LPS/kg) an und blieb bis zum Versuchsende erhöht. Die Na^+ -Konzentration war in Tieren der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum konstant um 139 mmol/l. Ab 90 Minuten nach der LPS-Gabe zeigte sich zunächst in allen mit LPS behandelten Gruppen eine signifikante Abnahme (NaCl-Kontrolle: $139,4 \pm 0,5$ mmol/l; 2,5 mg LPS/kg $136,2 \pm 0,5$ mmol/l; 5,0 mg LPS/kg $136,8 \pm 0,5$ mmol/l; 7,5 mg LPS/kg $136,6 \pm 0,2$ mmol/l), aber schon bei der nächsten Messung nach 180 Minuten bestand zwischen der NaCl-Kontrolle und den drei LPS-Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied in der Na^+ -Konzentration mehr. Am Versuchsende nach 300 Minuten war das Na^+ dagegen bei den mit LPS behandelten Tieren signifikant höher als in der NaCl-Kontrollgruppe (Tab. 3.1). Die Ca^{2+} -Konzentration in Tieren der NaCl-Kontrollgruppe lag über die

gesamte Dauer des Experiments zwischen $1,42 \pm 0,02$ und $1,49 \pm 0,01$ mmol/l, die LPS-Injektion bewirkte dosisunabhängig ab 90 Minuten eine signifikante Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle: $1,49 \pm 0,01$ mmol/l; 2,5 mg LPS/kg $1,31 \pm 0,02$ mmol/l; 5,0 mg LPS/kg $1,34 \pm 0,02$ mmol/l; 7,5 mg LPS/kg $1,32 \pm 0,02$ mmol/l). Bis zum Versuchsende blieb die Ca^{2+} -Konzentration in den drei LPS-Gruppen signifikant niedriger als in Tieren der NaCl-Kontrollgruppe. Die Cl^- -Konzentration im Blut der mit LPS behandelten Tiere war dosisunabhängig nach spätestens 180 Minuten signifikant erhöht und blieb es auch bis zum Versuchsende. Die Hämoglobinkonzentration zeigte 90 Minuten nach LPS-Applikation einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle: $12,7 \pm 0,4$ g/dl; 2,5 mg LPS/kg: $16,1 \pm 0,5$ g/dl; 5,0 mg LPS/kg: $15,2 \pm 0,5$ g/dl; 7,5 mg LPS/kg: $16,3 \pm 0,6$ g/dl). Gegen Versuchsende glichen sich die Werte der LPS-Gruppen wieder der Kontrollgruppe an und es gab keinen signifikanten Unterschied mehr. Analog dazu war auch der Verlauf des Hämatokrits über den gesamten Versuchszeitraum. Auch hier lagen die Werte der Tiere aus den drei LPS-Gruppen 90 Minuten nach der LPS-Injektion mit $49,1 \pm 1,5\%$ (2,5 mg LPS/kg), $46,5 \pm 1,6\%$ (5,0 mg LPS/kg) bzw. $50,0 \pm 1,7\%$ (7,5 mg LPS/kg) signifikant höher im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe mit $39,0 \pm 1,3\%$. Wie auch beim Hb, glichen sich die Hämatokritwerte der LPS-Gruppen im weiteren Versuchsverlauf wieder denen der NaCl-Kontrollgruppe an, sodass am Versuchsende kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden war. In den Tieren der mit 2,5 mg LPS/kg behandelten Versuchsgruppe war ab 180 Minuten nach der LPS-Injektion kein signifikanter Unterschied in beiden Parametern messbar. Die Osmolalität im Blut blieb bei allen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf konstant.

Die Metabolite Glukose und Laktat wurden beide durch die LPS-Injektion dosisunabhängig stark beeinflusst. Während der Glukosespiegel in den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe über die gesamte Versuchszeit zwischen 186 ± 7 und 164 ± 7 mg/dl lag, führte die Gabe von LPS bei allen drei getesteten Dosierungen nach 90 Minuten zunächst zu einer signifikanten Erhöhung der Glukose-Konzentration im Blut der Versuchstiere (2,5 mg LPS/kg: 304 ± 23 mg/dl; 5,0 mg LPS/kg: 263 ± 20 mg/dl; 7,5 mg LPS/kg: 343 ± 19 mg/dl). Im späteren Verlauf (nach 180 und 300 Minuten) war die Glukose-Konzentration aller LPS-Gruppen im Vergleich mit der NaCl-Kontrollgruppe dagegen signifikant erniedrigt. So zeigten am Versuchsende die Tiere aller mit LPS behandelten Gruppen eine ausgeprägte

Hypoglykämie. Die Laktat-Konzentration im Blut der Tiere war in den drei LPS-Gruppen bereits nach 90 Minuten signifikant im Vergleich zur NaCl-Kontrolle erhöht. Statistisch relevante Unterschiede zwischen den drei LPS-Konzentrationen zeigten sich dabei nicht.

Tab. 3.1: Effekte von LPS auf die Parameter der Blutgasanalyse, Elektrolyte, metabolische Parameter sowie den Hb und Hämatokrit der Ratte

Gruppe	Vor Infusion	Vor LPS	90 min nach LPS	180 min nach LPS	300 min nach LPS
pH					
NaCl-Kontrolle	7,33 ± 0,01	7,26 ± 0,01	7,30 ± 0,04	7,31 ± 0,03	7,27 ± 0,03
LPS (2,5 mg)	7,33 ± 0,01	7,27 ± 0,01	7,25 ± 0,01*	7,21 ± 0,03*	7,23 ± 0,01
LPS (5,0 mg)	7,33 ± 0,01	7,26 ± 0,02	7,22 ± 0,01*	7,22 ± 0,03*	7,19 ± 0,04
LPS (7,5 mg)	7,33 ± 0,01	7,28 ± 0,01	7,23 ± 0,01*	7,21 ± 0,01*	7,18 ± 0,03*
P _{CO2} [mmHg]					
NaCl-Kontrolle	56,1 ± 1,4	58,8 ± 1,4	51,6 ± 2,5	52,1 ± 3,7	52,9 ± 6,1
LPS (2,5 mg)	54,4 ± 0,8	60,7 ± 3,1	46,0 ± 2,1	48,3 ± 3,1	44,5 ± 2,8
LPS (5,0 mg)	56,3 ± 2,1	60,8 ± 1,4	46,0 ± 1,6	49,6 ± 4,1	46,0 ± 4,4
LPS (7,5 mg)	50,6 ± 1,0	56,2 ± 1,2	43,9 ± 1,9*	45,6 ± 4,7	50,5 ± 6,1
P _{O2} [mmHg]					
NaCl-Kontrolle	548 ± 9	516 ± 15	483 ± 25	447 ± 13	459 ± 26
LPS (2,5 mg)	530 ± 11	506 ± 8	138 ± 16*	205 ± 28*	239 ± 40*
LPS (5,0 mg)	533 ± 7	497 ± 8	144 ± 19*	216 ± 37*	143 ± 22*
LPS (7,5 mg)	530 ± 2	486 ± 8	110 ± 10*	188 ± 22*	180 ± 39*
Arterielle Sauerstoffsättigung [%]					
NaCl-Kontrolle	97,4 ± 0,2	97,1 ± 0,1	96,9 ± 0,1	97,0 ± 0,1	96,8 ± 0,1
LPS (2,5 mg)	97,6 ± 0,3	97,3 ± 0,1	95,1 ± 0,5	96,4 ± 0,4	95,8 ± 0,3
LPS (5,0 mg)	97,1 ± 0,1	97,1 ± 0,1	94,3 ± 1,1	96,2 ± 0,2	91,8 ± 3,8
LPS (7,5 mg)	97,1 ± 0,0	97,1 ± 0,0	90,8 ± 1,6*#†	94,6 ± 0,8*#†	94,4 ± 0,8
Basenüberschuss [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	3,6 ± 0,2	1,0 ± 0,5	-0,3 ± 0,6	-0,2 ± 0,1	-1,3 ± 0,6
LPS (2,5 mg)	2,4 ± 1,0	1,0 ± 0,8	-7,1 ± 0,7*	-6,0 ± 0,7*	-9,1 ± 0,2*
LPS (5,0 mg)	2,2 ± 0,4	1,4 ± 0,9	-8,2 ± 0,5*	-7,2 ± 0,5*	-9,7 ± 0,2*
LPS (7,5 mg)	1,2 ± 0,4	-0,3 ± 0,6	-8,4 ± 0,8*	-8,6 ± 1,0*#	-11,3 ± 1,1*#
Standardbikarbonat [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	26,4 ± 0,1	23,9 ± 0,4	23,8 ± 0,5	23,3 ± 0,4	22,4 ± 0,7
LPS (2,5 mg)	23,6 ± 1,8	23,9 ± 0,6	18,1 ± 0,5*	18,6 ± 0,5*	16,8 ± 0,1*
LPS (5,0 mg)	26,0 ± 0,8	24,5 ± 1,0	17,3 ± 0,6*	17,9 ± 0,5*	15,6 ± 0,7*
LPS (7,5 mg)	24,4 ± 0,4	23,2 ± 0,6	17,3 ± 0,6*	16,4 ± 0,4*#†	14,8 ± 0,9*
K ⁺ [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	4,48 ± 0,09	5,06 ± 0,05	4,60 ± 0,11	4,46 ± 0,04	4,23 ± 0,10
LPS (2,5 mg)	4,42 ± 0,03	5,22 ± 0,09	4,55 ± 0,12	5,42 ± 0,17*	5,75 ± 0,17*
LPS (5,0 mg)	4,50 ± 0,07	4,97 ± 0,14	4,72 ± 0,10	5,64 ± 0,16*	5,47 ± 0,23*
LPS (7,5 mg)	4,33 ± 0,17	4,92 ± 0,14	4,67 ± 0,16	5,33 ± 0,16*	5,80 ± 0,24*
Na ⁺ [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	139,5 ± 0,4	139,2 ± 0,3	139,4 ± 0,6	139,2 ± 0,5	138,4 ± 0,2
LPS (2,5 mg)	137,3 ± 1,6	137,8 ± 0,3	136,2 ± 0,5*	138,3 ± 1,3	140,3 ± 0,9*
LPS (5,0 mg)	139,4 ± 0,7	138,5 ± 0,7	136,8 ± 0,5*	139,5 ± 0,5	141,3 ± 0,6*
LPS (7,5 mg)	138,8 ± 0,4	138,2 ± 0,7	136,6 ± 0,2*	139,0 ± 0,4	140,7 ± 0,4*

Gruppe	Vor Infusion	Vor LPS	90 min nach LPS	180 min nach LPS	300 min nach LPS
Ca²⁺ [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	1,43 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,49 ± 0,01	1,46 ± 0,01	1,42 ± 0,02
LPS (2,5 mg)	1,43 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,31 ± 0,02*	1,37 ± 0,02*	1,26 ± 0,01*
LPS (5,0 mg)	1,42 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,34 ± 0,02*	1,37 ± 0,01*	1,28 ± 0,02*
LPS (7,5 mg)	1,43 ± 0,01	1,47 ± 0,02	1,32 ± 0,02*	1,39 ± 0,02*	1,27 ± 0,02*
Cl⁻ [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	106,5 ± 0,8	110,2 ± 0,7	111,8 ± 1,0	112,4 ± 0,4	111,2 ± 0,6
LPS (2,5 mg)	107,4 ± 1,1	108,8 ± 1,0	113,5 ± 0,8	118,6 ± 0,7*†	118,7 ± 0,9*
LPS (5,0 mg)	107,4 ± 0,7	108,2 ± 0,9	114,7 ± 0,8*	116,7 ± 0,2*	119,8 ± 1,0*
LPS (7,5 mg)	109,2 ± 0,6	110,0 ± 0,8	112,8 ± 0,5	118,2 ± 0,6*†	119,8 ± 0,5*
Hämoglobingehalt [g/dl]					
NaCl-Kontrolle	14,6 ± 0,3	13,6 ± 0,3	12,7 ± 0,4	12,8 ± 0,2	12,7 ± 0,1
LPS (2,5 mg)	14,2 ± 0,4	14,1 ± 0,1	16,1 ± 0,5*	13,8 ± 0,5	13,5 ± 0,6
LPS (5,0 mg)	13,3 ± 0,1	13,2 ± 0,2	15,2 ± 0,5*	14,4 ± 0,6*	13,0 ± 0,3
LPS (7,5 mg)	13,5 ± 0,5	13,1 ± 0,4	16,3 ± 0,6*	14,8 ± 0,3*	13,4 ± 0,4
Hämatokrit [%]					
NaCl-Kontrolle	44,7 ± 0,9	41,8 ± 0,8	39,0 ± 1,3	38,6 ± 1,0	39,0 ± 0,2
LPS (2,5 mg)	43,5 ± 1,1	43,1 ± 0,3	49,1 ± 1,5*	42,3 ± 1,4	41,8 ± 1,7
LPS (5,0 mg)	41,0 ± 0,3	40,5 ± 0,6	46,5 ± 1,6*	44,2 ± 1,8*	39,8 ± 0,9
LPS (7,5 mg)	41,5 ± 1,6	40,2 ± 1,3	50,0 ± 1,7*	45,4 ± 0,9*	41,3 ± 1,1
Osmolalität [mmol/kg]					
NaCl-Kontrolle	289,3 ± 0,7	287,4 ± 0,7	287,8 ± 1,2	287,3 ± 1,1	286,2 ± 0,6
LPS (2,5 mg)	288,0 ± 0,9	285,5 ± 0,7	289,6 ± 1,1	285,2 ± 1,4	283,8 ± 1,7
LPS (5,0 mg)	287,4 ± 1,8	285,8 ± 1,7	288,2 ± 1,8	284,2 ± 0,6	284,7 ± 1,2
LPS (7,5 mg)	287,9 ± 0,6	285,8 ± 1,1	291,3 ± 0,9	284,1 ± 0,9*	283,1 ± 0,7
Glukose [mg/dl]					
NaCl-Kontrolle	186 ± 7	164 ± 7	164 ± 6	169 ± 12	168 ± 5
LPS (2,5 mg)	184 ± 6	169 ± 7	304 ± 23*	110 ± 5*	57 ± 10*
LPS (5,0 mg)	175 ± 8	159 ± 5	263 ± 20*	110 ± 6*	38 ± 9*
LPS (7,5 mg)	179 ± 8	171 ± 9	343 ± 19*†	122 ± 5*	37 ± 13*
Laktat [mmol/l]					
NaCl-Kontrolle	0,62 ± 0,07	0,62 ± 0,06	0,97 ± 0,11	1,22 ± 0,15	0,92 ± 0,05
LPS (2,5 mg)	0,72 ± 0,04	0,70 ± 0,06	2,08 ± 0,12*	1,72 ± 0,18	2,03 ± 0,23*
LPS (5,0 mg)	0,63 ± 0,03	0,62 ± 0,05	2,42 ± 0,21*	2,46 ± 0,34*	2,78 ± 0,40*
LPS (7,5 mg)	0,80 ± 0,11	0,82 ± 0,13	2,60 ± 0,18*#	2,52 ± 0,32*#	2,52 ± 0,26*

Angegeben sind die Blutgasparameter pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck (P_{O2}), Kohlendioxidpartialdruck (P_{CO2}), die arterielle Sauerstoffsättigung, der Basenüberschuss, das Standardbikarbonat sowie die Konzentration der Metabolite Glukose und Laktat, die Osmolalität, der Hämatokrit und die Hämoglobinkonzentration (Hb). Auch die Konzentration der Elektrolyte Kalium (K⁺), Natrium (Na⁺), Calcium (Ca²⁺) sind aufgeführt. Die Blutentnahmen erfolgten unmittelbar vor dem Infusionsbeginn (unmittelbar nach der Katheterisierung), vor der LPS-Gabe, sowie 90, 180 und 300 Minuten danach. Alle Gruppen wurden über die gesamte Versuchsdauer mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert (7 ml/kg × h⁻¹). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS, wurden aber mit dem gleichen Volumen 0,9 %NaCl-Lösung behandelt (1 ml/kg als Bolus). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM, n=6. *p < 0,05 (gegenüber NaCl-Kontrolle), #p < 0,05 (gegenüber 2,5 mg LPS/kg), †p < 0,05 (gegenüber 5,0 mg LPS/kg).

3.1.4. Effekte von Lipopolysacchariden auf die Schädigungsparameter des Dünndarms der Ratte

Abbildung 3.4 zeigt die Auswirkungen der LPS-Applikation auf die makroskopische Schädigung des Dünndarms und das Verhältnis des Darmgewichts zum Körpergewicht der Ratte als Maß für Flüssigkeitseinlagerungen im Lumen und eine Ödembildung in der Darmwand.

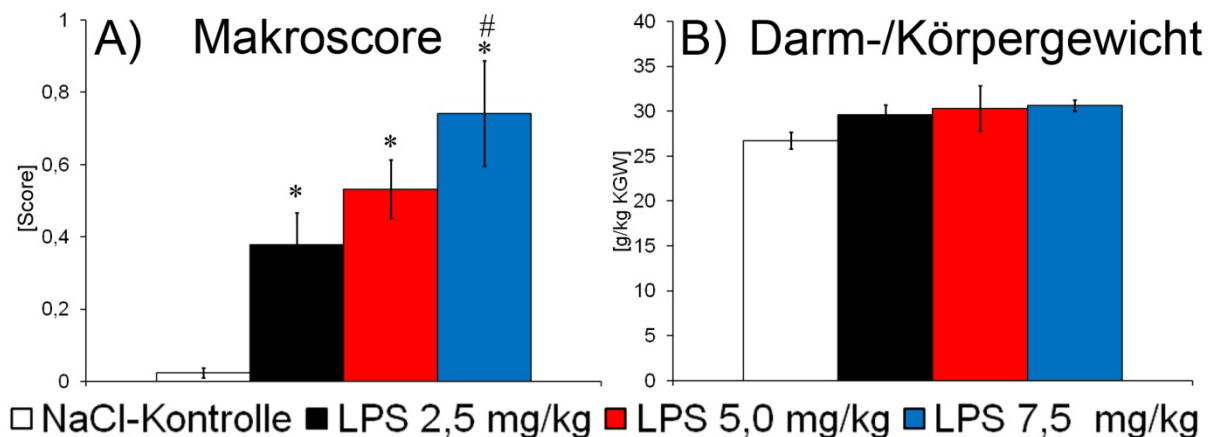


Abb. 3.4: Auswirkungen der verschiedenen LPS-Dosen auf den Makroscore und das Gewichtsverhältnis des Dünndarms zum Körpergewicht der Ratte. Gezeigt sind die makroskopischen Veränderungen des Dünndarms (Makroscore, A) und das Verhältnis von Dünndarm- zum Körpergewicht (B) 300 Minuten nach drei unterschiedlichen LPS-Dosen (2,5, 5,0 und 7,5 mg/kg). Alle Gruppen wurden über die gesamte Versuchsdauer mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS, wurden aber mit dem gleichen Volumen 0,9 % NaCl-Lösung behandelt (1 ml/kg als Bolus). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$. * $p < 0,05$ (gegenüber NaCl-Kontrolle), # $p < 0,05$ (gegenüber LPS 2,5 mg/kg).

Die mit dem von 0-9 reichenden Makroscore ermittelte Schädigung des Dünndarms viel generell sehr gering aus (Abb. 3.4A). Tiere der NaCl-Kontrollgruppe zeigten einen Makroscore von $0,02 \pm 0,01$. Bei den mit 2,5 mg LPS/kg behandelten Tieren betrug der Score $0,38 \pm 0,09$, nach 5,0 mg LPS/kg $0,53 \pm 0,08$ und nach der höchsten LPS-Dosis (7,5 mg LPS/kg) $0,74 \pm 0,15$. Somit zeigten alle mit LPS behandelten Tiere einen signifikant höheren Makroscore als die NaCl-Kontrolle. Außerdem besteht auch eine Korrelation zwischen der LPS-Dosis und der Höhe des Makroscores. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dabei nur zwischen der niedrigsten und der höchsten LPS-Dosis. Das in Abbildung 3.4B gezeigte Verhältnis des Dünndarmgewichts zum Körpergewicht wurde nicht signifikant durch die LPS-Injektionen verändert. Tiere der NaCl-Kontrollgruppe wiesen ein durchschnittliches

Darmgewicht von $26,7 \pm 0,9$ g pro kg KGW auf, während die mit LPS behandelten Gruppen mit $29,6 \pm 1,1$ g/kg (2,5 mg LPS/kg), $30,3 \pm 2,5$ g/kg (5,0 mg LPS/kg) bzw. $30,6 \pm 0,6$ g/kg (7,5 mg LPS/kg) ein nur leicht erhöhtes Darm-/Körpergewichts-Verhältnis hatten. Auch das prozentuale Verhältnis des Nass-/Trockengewichts als Maß für eine Ödembildung in der Darmwand (hier nicht gezeigt) wurde durch die LPS-Applikationen nicht signifikant beeinflusst.

3.1.5. Lipopolysaccharid-induzierte Veränderungen der Myeloperoxidaseaktivität und der Hämoglobinkonzentration in der Dünndarmwand, Niere, Leber und Lunge der Ratte

Die Messung der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität in den Überständen der Organhomogenate zeigte im Falle des Dünndarms (Abb. 3.5A) am Versuchsende (nach 300 Minuten) keine signifikanten Veränderungen durch die Applikation von LPS, unabhängig von dessen Dosierung. Die MPO-Aktivitäten lagen mit $0,12 \pm 0,02$ U/kg KGW bei Tieren der NaCl-Kontrolle und $0,14 \pm 0,02$ U/kg KGW (2,5 mg LPS/kg), $0,11 \pm 0,01$ U/kg KGW (5,0 mg LPS/kg) bzw. $0,12 \pm 0,02$ U/kg KGW (7,5 mg LPS/kg) bei den mit LPS behandelten Tieren nicht signifikant auseinander. Ein ähnlicher Befund ergab sich bei der Niere, denn auch hier kam es nur zu nicht signifikanten Veränderungen durch LPS (Abb. 3.5C). In der Leber (Abb. 3.5E) zeigte sich dagegen mindestens eine Verfünffachung der MPO-Aktivität von $10,3 \pm 1,8$ U je Gramm Einwaage (NaCl-Kontrolle) auf $45,8 \pm 7,4$ U/g (2,5 mg LPS/kg), $57,9 \pm 10,7$ U/g (5,0 mg LPS/kg) bzw. $93,8 \pm 39,8$ U/g (7,5 mg LPS/kg) je Gramm Gewebeeinwaage in den mit LPS behandelten Gruppen. Alle drei getesteten LPS-Dosen führten somit zu einem signifikanten Anstieg in diesem Parameter im Vergleich zur NaCl-Kontrolle, zeigten aber untereinander keine signifikanten Unterschiede. Die MPO-Aktivität je Gramm Einwaage im Homogenatüberstand der Lunge (Abb. 3.5G) war lediglich in den mit 5,0 mg LPS/kg behandelten Tieren signifikant von 67 ± 32 U/g (NaCl-Kontrolle) auf 219 ± 47 U/g (LPS 5,0 mg/kg) erhöht. Die beiden anderen LPS-Dosen (2,5 mg LPS/kg bzw. 7,5 mg LPS/kg) führten mit 152 ± 59 U/g bzw. 170 ± 37 U/g zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der MPO-Aktivität.

Die Ergebnisse der Messung des Hb in den Homogenatüberständen des Dünndarms, der Niere, der Leber und der Lunge sind in Abbildung 3.5 (B, D, F, H) dargestellt. Die Applikation der drei verschiedenen LPS-Dosen führte in der

Dünndarmwand (Abb. 3.5B) zu einem signifikanten Anstieg des Hb von $0,54 \pm 0,04 \mu\text{mol/kg KGW}$ in der NaCl-Kontrolle auf $0,80 \pm 0,05 \mu\text{mol/kg KGW}$ (2,5 mg LPS/kg), $0,84 \pm 0,05 \mu\text{mol/kg KGW}$ (5,0 mg LPS/kg) bzw. $0,82 \pm 0,05 \mu\text{mol/kg KGW}$ (7,5 mg LPS/kg).

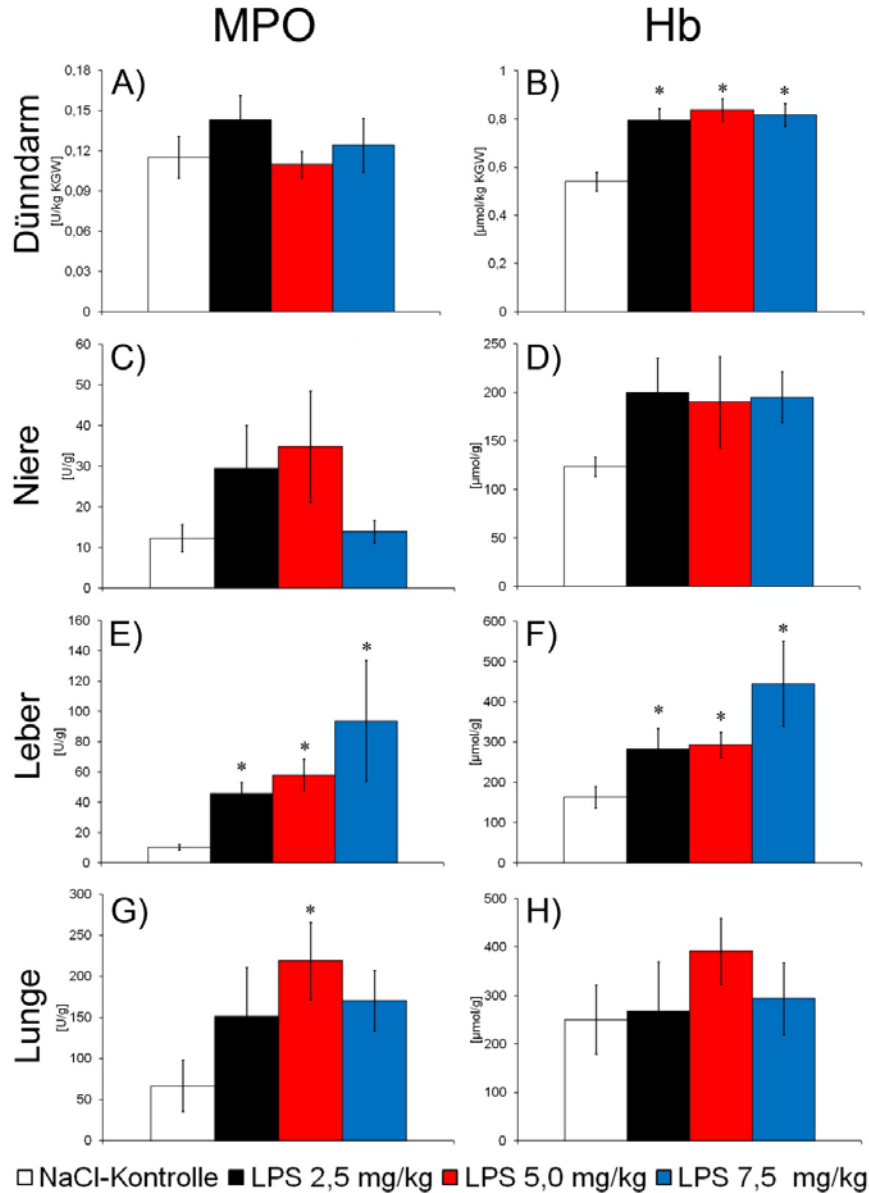


Abb. 3.5: Durch LPS-induzierte Veränderungen in der MPO-Aktivität und des Hb in den Homogenatüberständen des Dünndarms, der Niere, der Leber und der Lunge. Gezeigt sind die Veränderungen der MPO-Aktivität in den Homogenatüberständen des Dünndarms (A), der Niere (C), der Leber (E) und der Lunge (G) 300 Minuten nach LPS-Applikation in drei unterschiedlichen Dosen (2,5, 5,0 und 7,5 mg/kg). Ebenfalls dargestellt sind die Änderung der Hämoglobinkonzentration (Hb) in den Homogenatüberständen des Dünndarms (B), der Niere (D), der Leber (F) und der Lunge (H). Alle Gruppen wurden über die gesamte Versuchsdauer mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$). Tiere der Kontrollgruppe (NaCl-Kontrolle) erhielten kein LPS, wurden aber mit dem gleichen Volumen 0,9 % NaCl-Lösung behandelt (1 ml/kg als Bolus). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$. * $p < 0,05$ (gegenüber NaCl-Kontrolle).

Im Homogenatüberstand der Niere kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg im Hb von $124 \pm 10 \mu\text{mol/g}$ in Tieren der NaCl-Kontrolle auf $200 \pm 35 \mu\text{mol/g}$ (2,5 mg LPS/kg), $190 \pm 47 \mu\text{mol/g}$ (5,0 mg LPS/kg) bzw. $195 \pm 26 \mu\text{mol/g}$ nach der Applikation von 7,5 mg LPS/kg (Abb. 3.5D). In der Leber kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Hb-Gehaltes nach Behandlung der Tiere mit LPS (Abb. 3.5F). Bei Tieren der NaCl-Kontrollgruppe lag der Hb bei $163 \pm 27 \mu\text{mol/g}$ und erhöhte sich bei den mit LPS behandelten Tieren auf $283 \pm 51 \mu\text{mol/g}$ (2,5 mg LPS/kg), $293 \pm 32 \mu\text{mol/g}$ (5,0 mg LPS/kg) bzw. $445 \pm 106 \mu\text{mol/g}$ (7,5 mg LPS/kg). In der Lunge war keine signifikante durch LPS verursachte Veränderung im Hb nachweisbar (Abb. 3.5H).

3.1.6. Schlussfolgerungen aus der Modelletablierungsserie

Generell zeigten sich in den meisten der in Kapitel 3.1 aufgeführten Parameter signifikante Effekte durch die Applikation von LPS. Allerdings traten signifikante Unterschiede durch die drei LPS-Dosen (2,5, 5,0 und 7,5 mg/kg) nur in vereinzelt Parametern der Blutgasanalysen (Tab. 3.1) und dem Makroscore des Dünndarms (Abb. 3.4A) auf. In diesen Fällen unterschied sich fast ausschließlich die höchste von der niedrigsten LPS-Dosis. Da sich kaum nennenswerte Unterschiede zwischen den drei getesteten Dosen ergaben, fiel die Wahl für alle weiterführenden Untersuchungen (Kap. 3.2) auf die geringste Dosis von 2,5 mg LPS/kg Körpergewicht der Ratte.

Einige der in der Modelletablierungsserie gemessenen Parameter erwiesen sich als wenig aussagekräftig und wurden daher in den eigentlichen Untersuchungen zu den Schutzstoffeffekten nicht weiter verfolgt. Dazu zählt der von 0 (keine Schädigung) bis 9 (maximale Schädigung) reichende Makroscore des Dünndarms (Abb. 3.4A), der trotz des signifikanten Anstiegs nach LPS-Applikation am unteren Rande seines Auflösungsvermögens lag. So betrug der durchschnittliche Score selbst bei der höchsten LPS-Dosis von 7,5 mg/kg lediglich $0,74 \pm 0,15$. Auch die Gewichtsverhältnisse der Niere, der Leber, der Lunge und des Herzens zum Körpergewicht der Ratte erwiesen sich als nicht aussagekräftig, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren der NaCl-Kontrollgruppe und den mit LPS behandelten Ratten messbar waren (nicht gezeigt).

3.2. Die Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit im lipopolysaccharid-induzierten Schock der Ratte (Serie 2 und 3)

3.2.1. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Organhistologie

Bei den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe waren am Versuchsende keine histopathologischen Veränderungen im Gewebe des Dünndarms, der Niere, der Leber, des Herzens und der Lunge nachweisbar (Abb. 3.6 und 3.7).

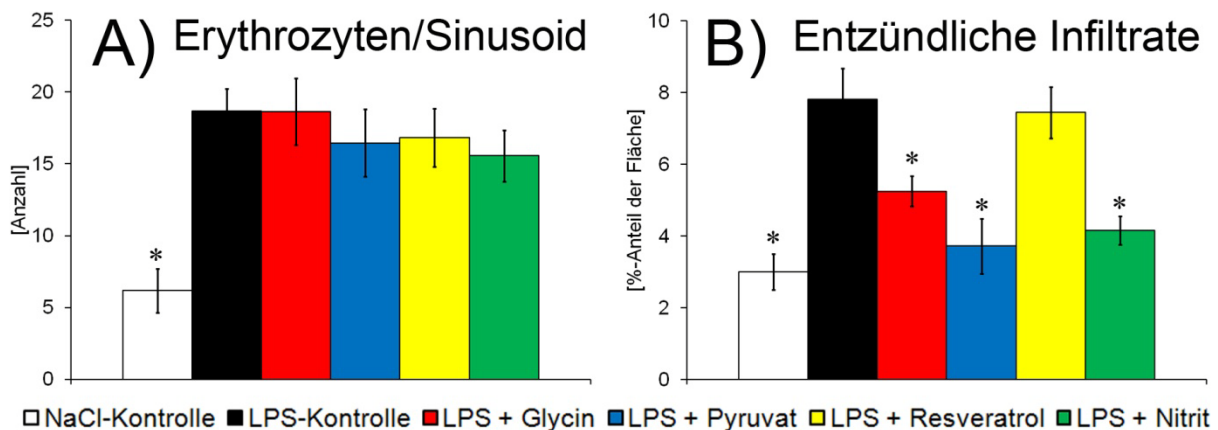


Abb. 3.6: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierte Anzahl der Erythrozyten in den Sinusoiden und die Bildung entzündlicher Infiltrate in der Rattenleber. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten bevor LPS (2.5 mg/kg) injiziert wurde (1 ml/kg). Tiere der LPS- und NaCl-Kontrollgruppe (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0.9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Die Anzahl der Erythrozyten in den Sinusoiden (A) und der prozentuale Flächenanteil entzündlicher Infiltrate (B) wurden in Dünnschnitten der Leber am Versuchsende (300 Minuten nach der LPS-Injektion) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrolle).

Die Infusionen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatten keinen nachweisbaren Effekt auf die histopathologischen Veränderungen der verschiedenen Organe (nicht dargestellt). Lediglich der prozentuale Flächenanteil der inflammatorischen Infiltrate im Parenchym der Leber wurde signifikant durch Glycin, Pyruvat und Resveratrol vermindert (Abb. 3.6).

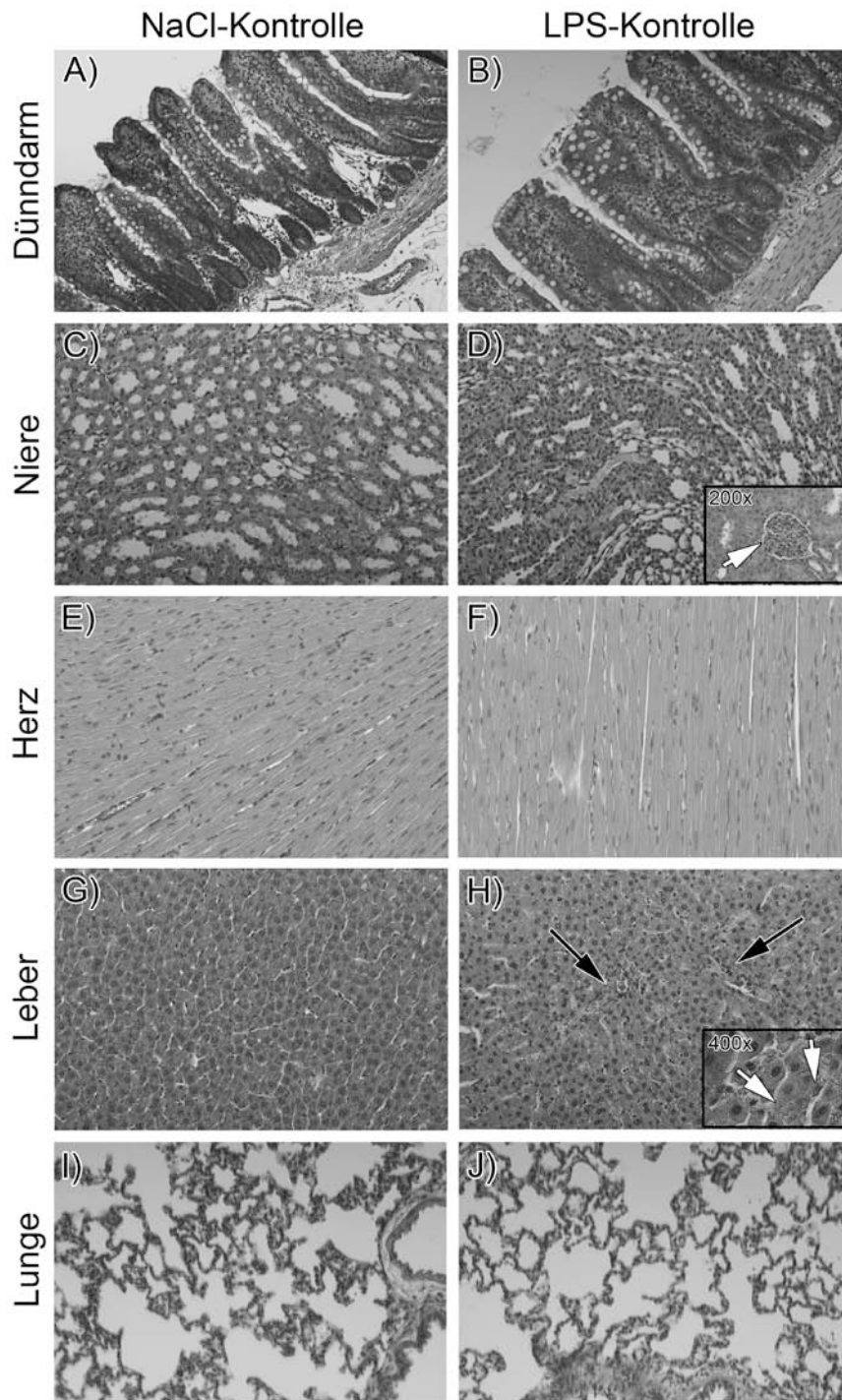


Abb. 3.6: Effekte von LPS auf die Histologie von Dünndarm, Niere, Herz, Leber und Lunge der Ratte. LPS wurde in 0.9% NaCl-Lösung gelöst und mit einer Dosis von 2.5 mg/kg (1 ml/kg) in die *V. femoralis* von anästhesierten Ratten injiziert. Alle Tiere der LPS- und NaCl-Kontrolle (keine LPS Injektion) erhielten nur 0.9%ige NaCl-Lösung ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$). Dünndarm (A/B), Niere (C/D), Herz (E/F), Leber (G/H) und Lunge (I/J) wurden am Versuchsende (300 Minuten nach LPS-Injektion) reseziert. Weißer Pfeil in D) markiert einen leicht atrophierten Glomerulus der Niere. Die schwarzen Pfeile in H) zeigen auf inflammatorische Infiltrate in der Leber. Die weißen Pfeile in H) zeigen auf Erythrozyten in den Sinusoiden. Hematoxylin-Eosin-Färbung; Original-Vergrößerung: 100x. Die gezeigten Fotos sind repräsentativ für die Organe von n=8 Tieren pro Gruppe.

Die LPS-Injektion bewirkte nur geringe histologisch nachweisbare Organschädigungen. So stieg der von 0 bis 8 reichende Park/Chiu-Score (nicht dargestellt) 300 Minuten nach der LPS-Gabe auf nur $0,19 \pm 0,13$ an (Abb. 3.7B). Im Herzen und der Lunge konnten keine histologischen Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 3.7F, J). In der Niere waren Einblutungen im Cortex und der Medulla sichtbar, diese machten aber weniger als 5 % der betrachteten Fläche aus. Bei den Glomeruli der Niere fanden sich bei $22,1 \pm 5,5$ % leichte Anzeichen einer Atrophie (Abb. 3.7D). Die deutlichsten LPS-induzierten histopathologischen Veränderungen traten in der Leber auf. Dort enthielten die Sinusoide der mit LPS behandelten Ratten signifikant mehr Erythrozyten als die Tiere der NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 3.6 und 3.7H).

3.2.2. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Hämoglobin-Konzentration im Gewebe des Dünndarms, der Niere, Leber und Lunge

Da schon in der Modelletablierungsserie (Kapitel 3.1.5) kein signifikanter Unterschied der MPO-Aktivität in den Überständen der Gewebehomogenate des Dünndarms zwischen der NaCl- und LPS-Kontrollgruppe bestand, wurde dieses Verfahren in der zweiten Serie durch ein histologisches Verfahren zum Nachweis der Neutrophilen ersetzt (CE-Färbung; Tab. 3.2). Die Messung der Hb-Konzentration im Gewebehomogenat des Dünndarms zeigte einen Anstieg von $0,51 \pm 0,02$ auf $0,84 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/l/kg KGW}$ (nicht dargestellt). In der Niere und Leber zeigte sich in diesem Parameter ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen (nicht dargestellt). Im Homogenatüberstand der Lunge kam es zu einer geringen LPS-induzierten Zunahme der Hb-Konzentration in diesem Organ (von 125 ± 40 auf 198 ± 36 $\mu\text{mol/g}$; ohne Abbildung).

Die Behandlung der Ratten mit Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte im Falle der Leber keinen Effekt auf die Hb-Konzentration im Homogenatüberstand. In der Lunge verminderten dagegen alle Substanzen signifikant die LPS-induzierte Zunahme der Hb-Konzentration.

3.2.3. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Organen

Die Injektion von LPS führte in der Niere, der Leber, der Lunge und im Herzen einen signifikanten Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten, während im Dünndarm

keine statistisch signifikante Zunahme zu erkennen war (Tab. 3.2). So stieg deren Quantität dort von $36,6 \pm 3,7$ ohne LPS-Behandlung der Tiere auf $41,2 \pm 2,7$ in der LPS-Kontrollgruppe. In der Niere verzehnfachte sich die Zahl der Granulozyten von $2,3 \pm 0,2$ auf $25,7 \pm 2,1$ und in der Leber von $4,9 \pm 0,9$ auf $50,5 \pm 4,7$. Eine Verdopplung der Granulozytenzahl konnte in der Lunge (von $56,5 \pm 4,5$ auf $123,2 \pm 6,0$) und im Herzen (von $1,5 \pm 0,01$ auf $3,7 \pm 0,5$) festgestellt werden.

Die Infusion von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte im Dünndarm und im Herzen keinen Effekt auf die Einwanderung neutrophiler Granulozyten. Die Behandlung der Ratten mit Pyruvat und Resveratrol verminderte die durch LPS ausgelöste Zunahme der Granulozytenzahl in der Niere, der Leber und der Lunge signifikant. Glycin hatte nur in der Leber einen signifikanten Effekt, während Nitrit in keinem der untersuchten Organe die Granulozytenzahl signifikant verminderte (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in den Dünndarm, die Niere, die Leber, die Lunge und das Herz der Ratte

Gruppe	Darm	Niere	Leber	Lunge	Herz
NaCl-Kontrolle	$36,6 \pm 3,7$	$2,3 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,9$	$56,5 \pm 4,5$	$1,5 \pm 0,1$
LPS-Kontrolle	$41,2 \pm 2,7$	$25,7 \pm 2,1\#$	$50,5 \pm 4,7\#$	$123,2 \pm 6,0\#$	$3,7 \pm 0,5\#$
LPS + Glycin	$43,2 \pm 1,3$	$25,8 \pm 1,6$	$37,1 \pm 2,9^*$	$120,7 \pm 5,2$	$4,3 \pm 0,3$
LPS + Pyruvat	$42,4 \pm 2,8$	$18,1 \pm 2,5^*$	$39,9 \pm 3,3^*$	$112,0 \pm 5,2^*$	$3,1 \pm 0,2$
LPS + Resveratrol	$41,8 \pm 1,7$	$19,1 \pm 1,0^*$	$40,8 \pm 1,9^*$	$110,3 \pm 4,0^*$	$3,5 \pm 0,2$
LPS +Nitrit	$42,0 \pm 2,5$	$23,8 \pm 2,8$	$49,6 \pm 3,3$	$136,2 \pm 6,4$	$4,6 \pm 0,5$

Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \text{ } \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Nitrit ($40 \text{ } \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder reine 0.9%ige NaCl-Lösung in der NaCl- LPS-Kontrollgruppe wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten vor der LPS-Injektion (2.5 mg/kg). Die Organe wurden am Versuchsende (300 Minuten nach LPS-Injektion) reseziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von sechs ausgezählten Gesichtsfeldern je Tier ($n=8$ pro Gruppe). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, $\#p < 0.05$ (vs. NaCl-Kontrolle.), $*p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrolle).

3.2.4. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Konzentrationen von freiem Hämoglobin und Nitrit + Nitrat im finalen Plasma sowie der Zytokine in den Organen

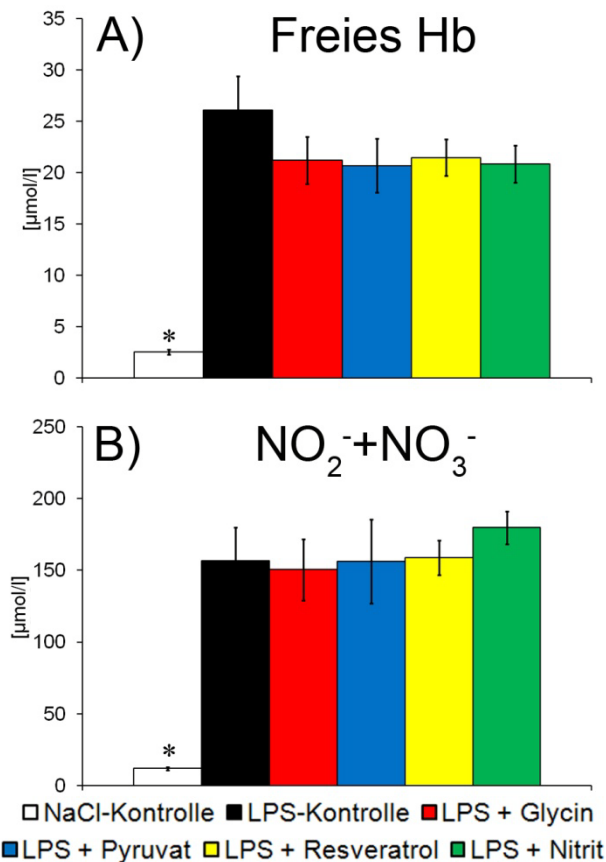


Abb. 3.8: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierten Änderungen der freien Hb- und Nitrit + Nitrat-Konzentration im Plasma der Ratte. Glycin (20 mg/kg × h), Natrium-Pyruvat (50 mg/kg × h⁻¹), Resveratrol (60 µg/kg × h⁻¹) oder Natrium-Nitrit (40 µg/kg × h⁻¹) wurden kontinuierlich infundiert (7 ml/kg × h⁻¹), beginnend 30 Minuten vor der Injektion von LPS (2.5 mg/kg). Tiere der LPS- und der NaCl-Kontrolle (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0.9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Die Konzentrationen des freien Hämoglobins (Hb; A) und von Nitrit + Nitrat (B) wurden im Plasma des am Versuchsende (300 min nach LPS-Injektion) entnommenen Blutes bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, n = 8. *p < 0.05 (vs. LPS-Kontroll-Gruppe).

Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich, war die Konzentration des freien Hämoglobins (Abb. 3.8A) – als Maß für das Auftreten einer Hämolyse – und die Nitrit + Nitrat-Konzentration (Abb. 3.8B) – als Maß für die NO-Bildung – am Versuchsende in den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe sehr gering (Hb: 2,53 ± 0,23 µM; Nitrit + Nitrat: 12 ± 1 µM). Die Injektion von LPS führte zu einer Verzehnfachung des Hb-Wertes (26,07 ± 3,35 µM) und die Nitrit + Nitrat-Konzentration stieg um das Dreizehnfache an (157 ± 23 µM). Die Behandlung der Tiere mit Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte keinen signifikanten Effekt auf den LPS-induzierten Anstieg beider Parameter.

Die in Abbildung 3.9 gezeigten Konzentrationen der Zytokine im Dünndarmgewebe, in der Niere, der Leber, im Herzen und der Lunge hingen sehr stark davon ab, welches Zytokin in welchem Organ gemessen wurde (Abb. 3.9). So war beispielsweise die IL-1α-Konzentration in der Lunge mit LPS behandelter Tiere, unabhängig vom Schutzstoff, etwa zwanzigmal höher als in der Niere oder dem Herzen.

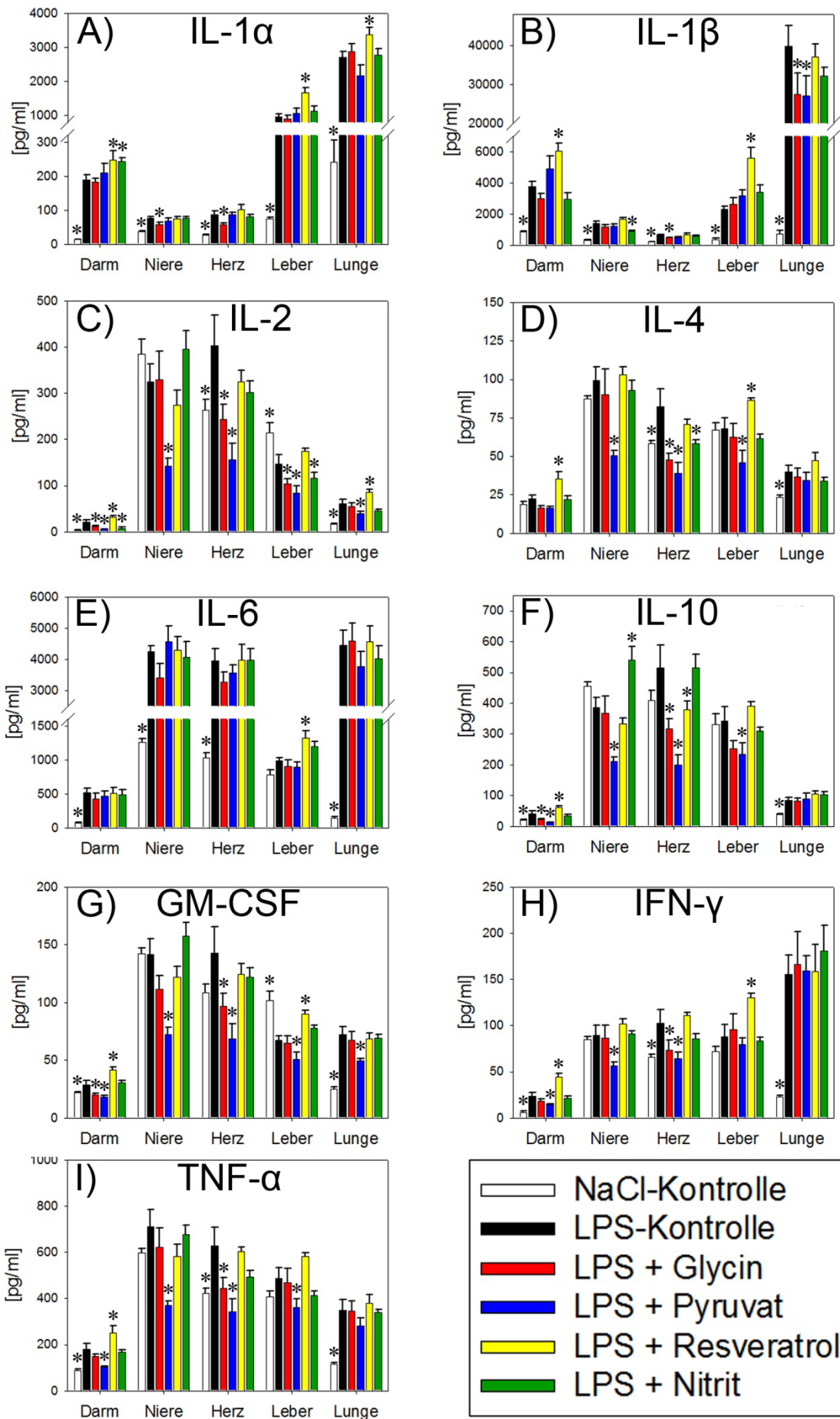


Abb. 3.9: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen in Dünndarm, Niere, Herz, Leber und Lunge der Ratte. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \text{ } \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \text{ } \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten bevor LPS (2.5 mg/kg) injiziert wurde (1 ml/kg). Tiere der LPS- und NaCl-Kontrolle (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0.9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Die Konzentrationen von Interleukin-1 α (IL-1 α , A), IL-1 β (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF, G), Interferon-gamma (IFN- γ , H) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α , I) wurden in Gewebelysaten des Dünndarms, der Niere, des Herzens, der Leber und der Lunge am Versuchsende (300 Minuten nach der LPS-Injektion) gemessen. Für die Messung wurde jeweils eine Gesamtproteinkonzentration von $125 \text{ } \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrolle).

Noch drastischer war der organbezogene Unterschied in den Konzentrationen von IL-1 β , so war dessen Konzentration in der Lunge ca. um das Fünfundvierzigfache höher im Vergleich zum Herzen. Grundsätzlich wurden bei allen Zytokinen (mit Ausnahme von IL-1 α und IL-1 β) im Dünndarmgewebe die niedrigsten Konzentrationen gemessen und fast alle der gemessenen Zytokine stiegen in ihrer Konzentration nach der Injektion von LPS signifikant an. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β stiegen im Dünndarmgewebe, in der Niere, in der Leber, im Herzen und in der Lunge 300 Minuten nach der Injektion von LPS signifikant an (Abb. 3.9A, B). Das ebenfalls pro-inflammatorische IL-2 (Abb. 3.9C) war im Dünndarmgewebe, im Herzen und in der Lunge am Versuchsende signifikant im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe erhöht, während seine Konzentration in der Leber signifikant abnahm. In der Niere kam es nur zu einer geringfügigen Änderung der IL-2-Konzentration nach der LPS-Behandlung der Tiere. Die Konzentration des als anti-inflammatorisch betrachtete IL-4 änderte sich 300 Minuten nach der LPS-Injektion im Dünndarmgewebe, in der Niere und der Leber kaum, zeigte aber im Herzen und in der Lunge eine signifikante Zunahme (Abb. 3.9D). Auch die Konzentration des pro-inflammatorischen IL-6 nahm in allen Organen, außer in der Leber, zu (Abb. 3.9E). Was durch LPS hervorgerufene Konzentrationsänderungen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 betrifft, gab es nur im Dünndarmgewebe und in der Lunge eine signifikante Zunahme (Abb. 3.9F). In den übrigen Organen traten keine statistisch signifikanten Veränderungen auf. Die GM-CSF-Konzentration war 300 Minuten nach der LPS-Gabe im Gewebe des Dünndarms und der Lunge signifikant erhöht, während in der Leber eine signifikant niedrigere Konzentration gemessen wurde (Abb. 3.9G). IFN- γ und TNF- α hatten signifikant erhöhte Konzentrationen am

Versuchsende im Dünndarmgewebe, im Herzen und in der Lunge, während in den übrigen Organen keine nennenswerte Konzentrationsänderung auftrat (Abb. 3.9H, I). Die Infusionen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit führten lediglich partiell zu Veränderungen hinsichtlich der durch LPS ausgelösten Zytokinfreisetzungen in den verschiedenen Organen. So verminderte Glycin den Anstieg der Zytokine fast ausschließlich im Dünndarmgewebe und dem Herzen (Abb. 3.9). Von allen untersuchten Substanzen bewirkte Pyruvat den deutlichsten mindernden Einfluss auf die Zytokin-Konzentrationen in den unterschiedlichen Organen. Dabei waren sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine betroffen. Im Gegensatz dazu kam es in den mit Resveratrol behandelten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung fast aller Zytokin-Konzentrationen im Dünndarmgewebe und in der Leber. Nur die Konzentration von IL-10 im Herzen wurde durch Resveratrol im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe signifikant gesenkt. Nitrit hatte im Vergleich mit der LPS-Kontrolle den geringsten Effekt auf die Organzytokinspiegel. Nur die Konzentrationen von IL-1 α im Gewebe des Dünndarms, IL-1 β in der Niere, IL-2 in Dünndarm und Leber sowie von IL-4 im Herzen wurden signifikant durch die Nitrit-Infusion gemindert. Die Konzentration von IL-10 in der Niere wurde durch Nitrit signifikant erhöht (Abb. 3.9).

3.2.5. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen im Blutbild und der Gerinnung

Durch LPS hervorgerufene Veränderungen im finalen Blutbild der Ratten zeigten sich vor allem im Thrombozyten- und Leukozytengehalt des Blutes (Abb. 3.10A-B). Im Blut der Tiere ohne LPS-Behandlung (NaCl-Kontrolle) befanden sich durchschnittlich 611 ± 28 Thrombozyten pro nl. Deren Anzahl reduzierte sich auf gut ein Drittel (238 ± 17 /nl) bei den mit LPS behandelten Kontrolltieren (Abb. 3.10A). Analog dazu fiel auch die Anzahl der gemessenen Leukozyten von $6,96 \pm 0,25$ /nl in der NaCl-Kontrolle auf $3,24 \pm 0,23$ /nl in der LPS-Kontrolle ab (Abb. 3.10B). In beiden Parametern konnte die Infusion von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit diesem Effekt nicht entgegenwirken. Die übrigen Parameter des Blutbildes wie die Anzahl der Erythrozyten, der Hb, Hämatokrit, das durchschnittliche Volumen der Erythrozyten (MVC), die durchschnittliche Hämoglobinmenge pro Erythrozyt (MCH) und der Anteil des Hämoglobins am Gesamtvolumen der Erythrozyten (MCHC) wurden weder durch LPS noch durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit signifikant verändert. Das Gerinnungssystem wurde durch die Injektion von LPS

signifikant beeinflusst. So fiel der Quick-Wert in der LPS-Kontrolle auf etwa 50 % ab (Abb. 3.10C). Analog dazu stieg die „International Normalized Ratio“ (INR) von $1,02 \pm 0,01$ (NaCl-Kontrolle) auf $1,55 \pm 0,20$ in der LPS-Kontrollgruppe signifikant an (Abb. 3.10D). Die Gerinnungsfähigkeit des Blutes nahm also infolge der LPS-Injektion ab. Auf diesen Effekt hatte keine der Testsubstanzen einen signifikanten Einfluss.

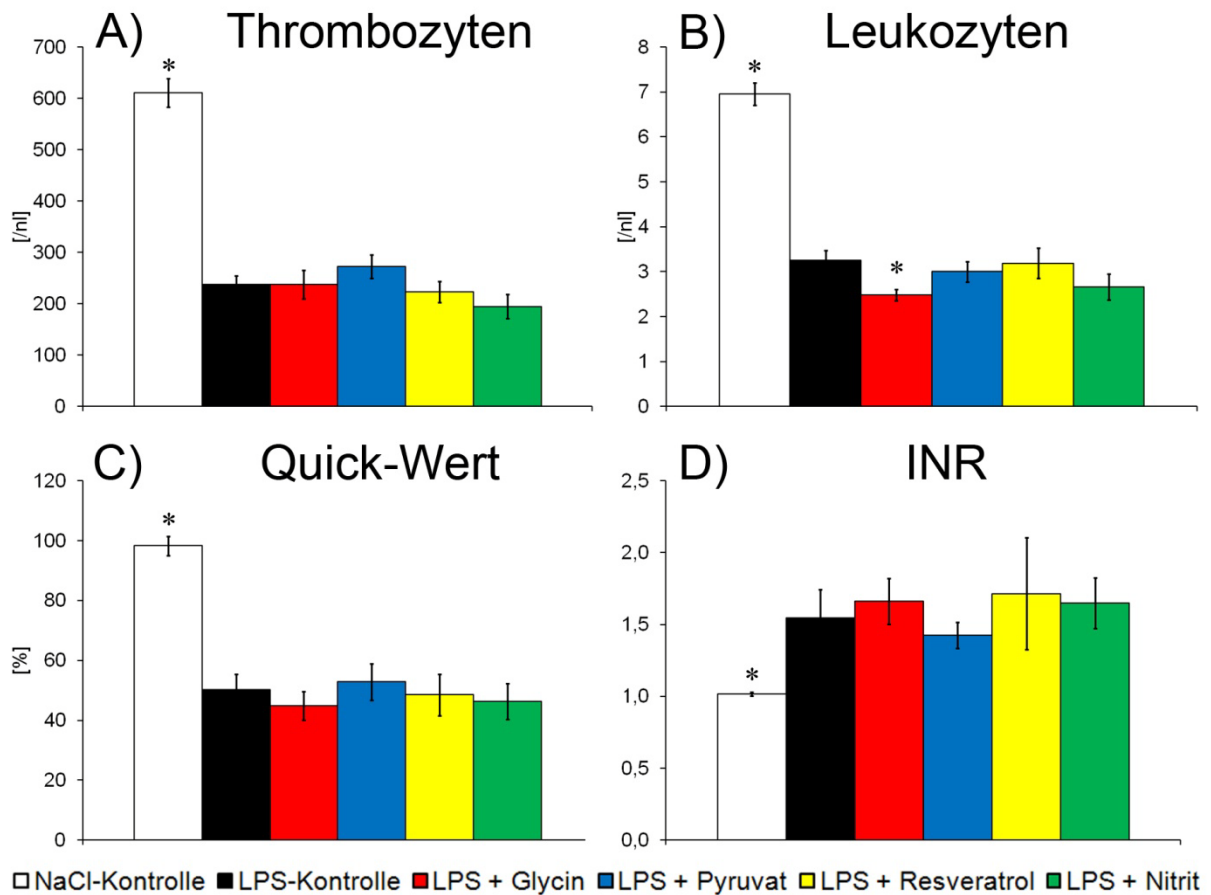


Abb. 3.10: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die durch LPS induzierten Veränderungen in der Hämatologie und Gerinnung der Ratte. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten bevor LPS (2.5 mg/kg) injiziert wurde (1 ml/kg). Tiere der LPS-Kontrolle und NaCl-Kontrolle (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0,9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Gezeigt werden der Gehalt an Thrombozyten (A) und Leukozyten (B), sowie die Gerinnungsparameter Quick-Wert (C) und „International Normalized Ratio“ (INR, D) des am Versuchsende (300 Minuten nach LPS-Gabe) entnommen Blutes. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrolle).

3.2.6. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf den Blutdruck und andere Vitalparameter im lipopolysaccharid-induzierten Schock

Zu Beginn der Versuche lag der MAP aller Tiere bei etwa 90 mmHg und im Falle der NaCl-Kontrollgruppe war dieser Wert auch recht konstant über die gesamte Versuchsdauer (Abb. 3.11A). Wie auch in der Modelletablierungsserie fiel der MAP in der LPS-Kontrollgruppe nach der intravenösen LPS-Applikation (2,5 mg/kg) innerhalb von 15 Minuten auf 36 ± 1 mmHg ab. Danach stieg er kontinuierlich wieder auf das Ausgangsniveau und darüber hinaus. Zum Versuchsende hin fiel der MAP dann wieder langsam auf 63 ± 6 mmHg ab. Die Infusion von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte keinen Einfluss auf den MAP in der Zeit vor der LPS-Applikation. Ebenso wurde der initiale, durch LPS induzierte Abfall des Blutdrucks nicht signifikant von einer der Substanzen beeinflusst. Allerdings zeigte sich, dass der weitere Verlauf des Blutdrucks durch alle Testsubstanzen, mit Ausnahme von Glycin, signifikant verbessert wurde. Am Versuchsende hatten alle Ratten, außer den mit Nitrit behandelten Tieren, einen deutlich höheren Blutdruck als die der LPS-Kontrollgruppe.

Die Herzfrequenz blieb in der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchsverlauf konstant zwischen 300 und 350 Schlägen/Minute (Abb. 3.11B). LPS führte etwa 40 Minuten nach der Applikation zu einem Anstieg der Herzfrequenz auf bis zu 400 Schlägen/Minute am Versuchsende. Dieser Anstieg in der Herzfrequenz wurde von keiner der vier Testsubstanzen signifikant beeinflusst. Die Atemfrequenz im Falle der NaCl-Kontrollgruppe, lag über die gesamte Versuchsdauer hinweg bei etwa 55 Atemzügen/Minute (Abb. 3.11C). Auch hier führte die Behandlung der Tiere mit LPS etwa 60 Minuten später zu einem deutlichen Anstieg auf über 75 Atemzüge/Minute. Dieser Effekt wurde durch keine der getesteten Substanzen signifikant gemindert. Ebenso wurde der schon in der Modelletablierungsserie beschriebene LPS-induzierte Anstieg der Körpertemperatur weder durch Glycin noch durch Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit signifikant beeinflusst (nicht dargestellt).

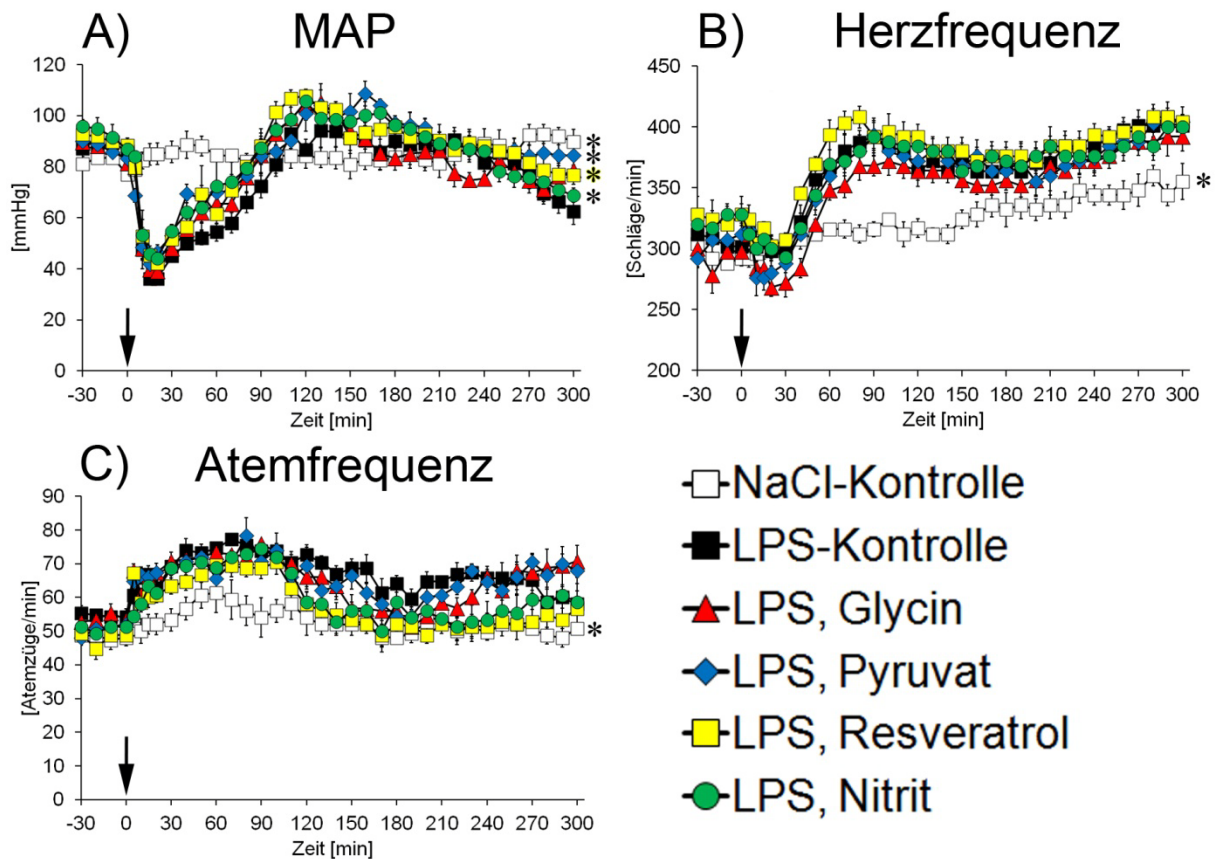


Abb. 3.11: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die durch LPS induzierten Veränderungen in den Vitalparametern der Ratte. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten bevor LPS (2.5 mg/kg) injiziert wurde (1 ml/kg ; Pfeile). Tiere der LPS- und NaCl-Kontrollgruppe (keine LPS-Injektion) erhielten das gleiche Volumen 0.9%iger NaCl-Lösung. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$. Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrolle über die gesamte Versuchszeit nach LPS-Applikation).

3.2.7. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Blutgasanalyseparameter, Elektrolyte, metabolischen Parameter, Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits

Wie schon für die Modelletablierungsserie beschrieben, führte die Injektion von LPS in der LPS-Kontrollgruppe zu einem raschen Abfall des pH-Werts, des P_{CO_2} , des Basenüberschusses und des Standardbikarbonats, d. h. zu einer metabolischen Azidose (Tab. 3.3). Darüber hinaus fiel auch der Sauerstoffpartialdruck (P_{O_2}) auf etwa ein Viertel seines Ausgangswertes ab. Gleichzeitig stieg die Konzentration der Elektrolyte K^+ und Cl^- an, während Ca^{2+} in der späten Phase des Experiments erniedrigt war. Die Na^+ -Konzentration wurde nur in der frühen Phase nach der LPS-

Gabe (nach 15 Minuten) signifikant gesenkt, im weiteren Versuchsverlauf waren keine signifikanten Unterschiede zur NaCl-Kontrolle messbar (Tab. 3.3). Die metabolischen Parameter wurden durch LPS ebenfalls signifikant verändert. So stieg der Blutzuckerspiegel innerhalb der ersten 60 Minuten nach der Injektion von LPS auf 330 mg/dl an, fiel dann aber auf ein hypoglykämisches Niveau am Ende der Experimente ab. Laktat – ein Marker für Gewebeischämie – stieg bereits fünf Minuten nach der LPS-Injektion signifikant an und blieb über den gesamten Versuchszeitraum erhöht. Auch der Hämatokrit und der Hb waren innerhalb der ersten 120 Minuten nach der LPS-Gabe auch eindeutig erhöht ($50.6 \pm 0.4\%$, 16.5 ± 0.1 g/dl; Tab. 3.3).

Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit hatten deutliche Auswirkungen auf jene Parameter, die eine durch LPS hervorgerufene metabolische Azidose und Gewebeischämie widerspiegeln (Tab. 3.3). Während Pyruvat dem Abfallen des pH-Wertes und des Basenüberschusses im Blut entgegenwirkte, wurde der Laktatspiegel, anders als für die ersten 120 Minuten nach LPS-Gabe in den übrigen Schutzstoffgruppen, nicht gesenkt. Der anfängliche Abfall des P_{O_2} wurde durch Resveratrol und Nitrit signifikant gemindert und die K^+ -Konzentration war in den mit Glycin oder Pyruvat behandelten Gruppen signifikant niedriger als in der LPS-Kontrollgruppe. Die durch LPS hervorgerufenen Veränderungen im P_{CO_2} , dem Glukosespiegel, Ca^{2+} , und Cl^- wurden kaum durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit beeinflusst. Es wurden keine negativen Effekte der Substanzen auf alle untersuchten Parametern festgestellt.

Tab. 3.3: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierten Veränderungen der Blutgasanalyseparameter, der Elektrolyte, des Hämoglobingehalts, des Hämatokrits, der Glukose und des Laktats bei Ratten

Gruppe	Vor Infusion	Vor LPS-Injektion	5 min nach LPS	15 min nach LPS	60 min nach LPS	120 min nach LPS	300 min nach LPS
pH							
NaCl-Ktrl.	$7,34 \pm 0,01$	$7,28 \pm 0,02$	$7,28 \pm 0,02$	$7,28 \pm 0,02$	$7,33 \pm 0,04$	$7,32 \pm 0,03$	$7,32 \pm 0,02$
LPS-Ktrl.	$7,34 \pm 0,01$	$7,30 \pm 0,01$	$7,21 \pm 0,02\#$	$7,21 \pm 0,01\#$	$7,24 \pm 0,02\#$	$7,23 \pm 0,02\#$	$7,20 \pm 0,02\#$
LPS, Gly	$7,33 \pm 0,01$	$7,28 \pm 0,01$	$7,24 \pm 0,01$	$7,24 \pm 0,01$	$7,26 \pm 0,01$	$7,23 \pm 0,01$	$7,27 \pm 0,03$
LPS, Pyr	$7,34 \pm 0,01$	$7,31 \pm 0,01$	$7,22 \pm 0,02$	$7,25 \pm 0,01^*$	$7,27 \pm 0,01$	$7,29 \pm 0,01^*$	$7,36 \pm 0,02^*$
LPS, Res	$7,33 \pm 0,01$	$7,30 \pm 0,01$	$7,25 \pm 0,02$	$7,26 \pm 0,01^*$	$7,27 \pm 0,01$	$7,26 \pm 0,01$	$7,26 \pm 0,02$
LPS, Nit	$7,33 \pm 0,01$	$7,27 \pm 0,02$	$7,24 \pm 0,02$	$7,25 \pm 0,01^*$	$7,27 \pm 0,01$	$7,23 \pm 0,02$	$7,22 \pm 0,04$
P_{O_2} [mmHg]							
NaCl-Ktrl.	448 ± 34	458 ± 12	475 ± 7	459 ± 32	406 ± 23	462 ± 12	438 ± 24
LPS-Ktrl.	504 ± 5	451 ± 7	$124 \pm 21\#$	$116 \pm 16\#$	$197 \pm 40\#$	$263 \pm 43\#$	$277 \pm 39\#$
LPS, Gly	461 ± 21	463 ± 12	227 ± 33	177 ± 25	257 ± 44	284 ± 33	255 ± 47
LPS, Pyr	501 ± 8	469 ± 8	218 ± 55	105 ± 11	216 ± 38	280 ± 38	291 ± 21
LPS, Res	498 ± 13	456 ± 16	$313 \pm 11^*$	204 ± 16	$333 \pm 15^*$	343 ± 26	274 ± 50

Gruppe	Vor Infusion	Vor LPS-Injektion	5 min nach LPS	15 min nach LPS	60 min nach LPS	120 min nach LPS	300 min nach LPS
LPS, Nit	429 ± 19	463 ± 11	286 ± 56*	259 ± 65*	309 ± 51*	357 ± 52	328 ± 31
P _{CO2} [mmHg]							
NaCl-Ktrl.	47,7 ± 1,0	53,7 ± 2,5	53,5 ± 1,4	54,0 ± 0,9	46,7 ± 5,0	44,8 ± 3,7	42,2 ± 1,7
LPS-Ktrl.	46,8 ± 1,1	50,7 ± 1,8	58,0 ± 4,2	41,1 ± 1,3#	39,0 ± 2,1#	35,7 ± 1,9#	38,1 ± 1,7
LPS, Gly	48,9 ± 1,8	54,5 ± 0,9	56,5 ± 0,9	43,0 ± 1,1	42,0 ± 2,0	40,5 ± 1,8	36,1 ± 3,7
LPS, Pyr	49,5 ± 1,6	48,9 ± 1,1	61,2 ± 4,3	43,9 ± 2,0	42,7 ± 1,1	40,7 ± 2,8	32,9 ± 2,6
LPS, Res	49,8 ± 1,3	48,1 ± 1,5	47,4 ± 1,8	40,6 ± 1,6	40,5 ± 1,4	38,6 ± 1,4	38,1 ± 2,2
LPS, Nit	53,0 ± 1,1	59,7 ± 1,6*	55,1 ± 3,9	44,7 ± 1,4	41,9 ± 0,7	40,8 ± 2,1	41,2 ± 5,6
Basenüberschuss [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	0,5 ± 0,4	-1,9 ± 0,2	-2,3 ± 0,3	-1,3 ± 0,9	-1,65 ± 0,5	-3,2 ± 0,3	-3,2 ± 0,2
LPS-Ktrl.	-0,2 ± 0,3	-1,7 ± 0,5	-4,5 ± 0,5#	-10,0 ± 0,3#	-10,1 ± 0,3#	-11,7 ± 0,4#	-13,0 ± 0,3#
LPS, Gly	-0,5 ± 0,5	-1,1 ± 0,4	-4,2 ± 0,5	-8,4 ± 0,4	-7,5 ± 0,7*	-9,8 ± 0,7*	-9,22 ± 0,8*
LPS, Pyr	1,1 ± 0,9	-1,2 ± 0,5	-3,0 ± 0,4*	-7,4 ± 0,5*	-6,7 ± 0,5*	-7,7 ± 0,5*	-7,5 ± 0,6*
LPS, Res	0,7 ± 0,3	-2,0 ± 0,2	-5,5 ± 0,3	-7,8 ± 0,4*	-7,5 ± 0,8*	-8,9 ± 0,8*	-10,9 ± 0,4*
LPS, Nit	0,5 ± 1,0	-0,8 ± 1,0	-3,9 ± 0,4	-7,1 ± 0,8*	-7,0 ± 0,3*	-8,9 ± 0,5*	-10,9 ± 0,6*
Standardbicarbonat [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	24,3 ± 0,4	22,0 ± 0,2	21,7 ± 0,3	22,6 ± 0,8	22,7 ± 0,5	21,8 ± 0,4	21,7 ± 0,2
LPS-Ktrl.	23,7 ± 0,3	22,3 ± 0,3	19,2 ± 0,3#	16,0 ± 0,2#	16,2 ± 0,3#	15,2 ± 0,3#	14,1 ± 0,6#
LPS, Gly	23,3 ± 0,3	22,6 ± 0,4	19,8 ± 0,3	17,4 ± 0,4*	18,1 ± 0,5*	16,4 ± 0,4*	16,9 ± 0,5*
LPS, Pyr	24,7 ± 0,7	22,8 ± 0,3	20,5 ± 0,3*	18,1 ± 0,2*	18,7 ± 0,3*	18,1 ± 0,4*	18,8 ± 0,4*
LPS, Res	23,9 ± 0,4	21,8 ± 0,3	19,2 ± 0,2	17,8 ± 0,2*	18,2 ± 0,6*	17,2 ± 0,5*	16,2 ± 0,4*
LPS, Nit	24,1 ± 0,7	22,7 ± 0,8	20,0 ± 0,4	18,1 ± 0,7*	18,4 ± 0,3*	16,5 ± 0,2*	15,5 ± 0,5*
K ⁺ [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	4,32 ± 0,07	5,04 ± 0,08	4,88 ± 0,08	4,87 ± 0,07	4,93 ± 0,14	4,67 ± 0,12	4,20 ± 0,07
LPS-Ktrl.	4,46 ± 0,09	4,99 ± 0,08	5,14 ± 0,09	4,97 ± 0,06	4,76 ± 0,12	5,08 ± 0,06#	5,99 ± 0,17#
LPS, Gly	4,40 ± 0,03	4,96 ± 0,05	4,95 ± 0,08	4,73 ± 0,06*	4,48 ± 0,06	4,77 ± 0,08	5,04 ± 0,09*
LPS, Pyr	4,50 ± 0,05	5,05 ± 0,14	4,88 ± 0,15	4,67 ± 0,12*	4,53 ± 0,19	4,77 ± 0,23	4,98 ± 0,24*
LPS, Res	4,62 ± 0,05	5,10 ± 0,03	5,10 ± 0,07	4,74 ± 0,04	4,67 ± 0,06	4,90 ± 0,09	5,70 ± 0,07
LPS, Nit	4,23 ± 0,11	4,98 ± 0,07	5,00 ± 0,11	4,83 ± 0,10	4,55 ± 0,09	4,96 ± 0,08	5,63 ± 0,23
Na ⁺ [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	140,2 ± 0,7	139,2 ± 0,5	139,0 ± 0,5	138,7 ± 0,5	138,2 ± 0,6	139,2 ± 0,5	138,8 ± 0,7
LPS-Ktrl.	138,7 ± 0,7	138,1 ± 0,6	137,7 ± 0,5	135,3 ± 0,7#	136,5 ± 0,7	138,1 ± 0,8	140,0 ± 0,3
LPS, Gly	138,7 ± 0,9	137,5 ± 0,9	137,7 ± 1,2	135,3 ± 1,1	134,8 ± 1,2	137,8 ± 1,1	141,0 ± 0,6
LPS, Pyr	137,7 ± 0,8	138,0 ± 0,7	138,6 ± 0,2	136,2 ± 0,4	135,2 ± 0,5	138,2 ± 0,7	142,7 ± 0,6*
LPS, Res	139,2 ± 0,4	139,5 ± 0,4	139,3 ± 0,6	137,8 ± 0,4*	137,7 ± 0,6	139,8 ± 0,3	141,0 ± 0,3
LPS, Nit	138,7 ± 0,7	137,3 ± 0,8	137,2 ± 0,4	136,0 ± 0,7	138,0 ± 0,5	140,2 ± 0,4	140,8 ± 0,7
Ca ²⁺ [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	1,47 ± 0,02	1,50 ± 0,01	1,48 ± 0,01	1,47 ± 0,02	1,47 ± 0,01	1,51 ± 0,01	1,46 ± 0,01
LPS-Ktrl.	1,45 ± 0,02	1,48 ± 0,02	1,50 ± 0,02	1,44 ± 0,03	1,41 ± 0,01#	1,43 ± 0,02#	1,29 ± 0,02#
LPS, Gly	1,48 ± 0,01	1,49 ± 0,01	1,51 ± 0,01	1,45 ± 0,01	1,37 ± 0,02*	1,42 ± 0,02	1,26 ± 0,03
LPS, Pyr	1,45 ± 0,01	1,49 ± 0,02	1,47 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,34 ± 0,01*	1,35 ± 0,02*	1,25 ± 0,02
LPS, Res	1,46 ± 0,02	1,53 ± 0,01	1,52 ± 0,01	1,46 ± 0,01	1,36 ± 0,01*	1,40 ± 0,02	1,30 ± 0,02
LPS, Nit	1,44 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,48 ± 0,01	1,43 ± 0,01	1,38 ± 0,01	1,40 ± 0,02	1,28 ± 0,01
Cl ⁻ [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	111,0 ± 1,4	112,7 ± 2,0	111,2 ± 0,6	112,4 ± 1,0	112,7 ± 1,8	111,2 ± 1,1	113,2 ± 1,4
LPS-Ktrl.	109,1 ± 1,5	110,7 ± 1,3	113,4 ± 2,3	113,8 ± 1,7	115,3 ± 1,4	120,9 ± 1,8#	120,9 ± 1,7#
LPS, Gly	109,0 ± 0,7	107,0 ± 0,8	110,4 ± 0,7	110,7 ± 1,3	110,5 ± 1,6*	115,5 ± 1,8*	118,3 ± 1,5
LPS, Pyr	105,7 ± 1,4	108,5 ± 1,6	108,3 ± 1,1*	109,7 ± 1,2*	109,7 ± 1,1*	112,7 ± 0,9*	117,7 ± 1,2
LPS, Res	108,7 ± 0,8	111,5 ± 1,1	113,2 ± 0,7	112,8 ± 0,4	113,5 ± 0,7	117,0 ± 0,7*	119,7 ± 0,5
LPS, Nit	106,7 ± 1,2	107,7 ± 1,7	109,2 ± 0,9*	110,5 ± 1,1	111,5 ± 1,3	114,8 ± 1,1*	118,0 ± 0,8
Hämoglobingehalt [g/dl]							
NaCl-Ktrl.	13,0 ± 0,3	12,4 ± 0,3	11,9 ± 0,3	12,1 ± 0,3	11,7 ± 0,1	11,0 ± 0,4	10,6 ± 0,3
LPS-Ktrl.	13,1 ± 0,2	12,4 ± 0,2	15,0 ± 0,3#	16,5 ± 0,1#	14,1 ± 0,4#	13,7 ± 0,3#	11,6 ± 0,2
LPS, Gly	13,2 ± 0,2	13,0 ± 0,2	14,5 ± 0,5	16,1 ± 0,3	14,1 ± 0,1	13,5 ± 0,3	11,6 ± 0,2
LPS, Pyr	13,2 ± 0,4	12,3 ± 0,4	14,3 ± 0,5	15,7 ± 0,4	13,2 ± 0,3	13,1 ± 0,2	11,3 ± 0,3
LPS, Res	13,5 ± 0,4	12,2 ± 0,2	13,4 ± 0,3*	15,3 ± 0,7*	13,5 ± 0,4	13,2 ± 0,4	11,3 ± 0,4

Gruppe	Vor Infusion	Vor LPS-Injektion	5 min nach LPS	15 min nach LPS	60 min nach LPS	120 min nach LPS	300 min nach LPS
LPS, Nit	13,3 ± 0,2	12,9 ± 0,2	14,7 ± 0,3	15,6 ± 0,4	13,2 ± 0,6	13,2 ± 0,4	10,7 ± 0,6
Hämatokrit [%]							
NaCl-Ktrl.	39,9 ± 0,9	38,2 ± 0,9	36,4 ± 0,7	37,2 ± 1,0	36,1 ± 0,4	34,0 ± 1,2	32,6 ± 1,0
LPS-Ktrl.	40,3 ± 0,6	38,3 ± 0,5	45,9 ± 1,1#	50,6 ± 0,4#	43,2 ± 1,1#	42,1 ± 1,0#	36,5 ± 0,8#
LPS, Gly	40,6 ± 0,7	40,0 ± 0,8	44,5 ± 1,4	49,3 ± 1,0	43,1 ± 0,2	41,5 ± 0,7	35,7 ± 0,6
LPS, Pyr	40,4 ± 1,0	37,9 ± 1,3	43,8 ± 1,4	48,0 ± 1,0	40,5 ± 0,8	40,3 ± 0,7	34,8 ± 0,9
LPS, Res	41,5 ± 1,3	37,6 ± 0,6	41,3 ± 0,9*	47,9 ± 2,1	41,4 ± 1,3	40,6 ± 1,2	34,7 ± 1,2
LPS, Nit	40,9 ± 0,6	39,7 ± 0,6	45,0 ± 1,0	47,7 ± 1,1	40,5 ± 1,9	40,7 ± 1,3	33,2 ± 1,9*
Glukose [mg/dl]							
NaCl-Ktrl.	183 ± 6	178 ± 11	176 ± 9	180 ± 11	185 ± 13	179 ± 8	170 ± 12
LPS-Ktrl.	167 ± 6	172 ± 7	213 ± 11	303 ± 6#	330 ± 11#	199 ± 16	19 ± 4#
LPS, Gly	192 ± 9	210 ± 19	232 ± 22	296 ± 17	366 ± 21	248 ± 24	42 ± 7
LPS, Pyr	178 ± 9	173 ± 26	207 ± 26	285 ± 31	394 ± 46	283 ± 26*	40 ± 8
LPS, Res	226 ± 27	167 ± 12	211 ± 23	245 ± 18*	307 ± 32	193 ± 19	37 ± 7
LPS, Nit	174 ± 18	209 ± 11	239 ± 7	291 ± 18	300 ± 33	165 ± 8	30 ± 6
Laktat [mmol/l]							
NaCl-Ktrl.	0,75 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,78 ± 0,08	0,88 ± 0,09	1,23 ± 0,12	1,18 ± 0,16	1,20 ± 0,10
LPS-Ktrl.	0,75 ± 0,02	0,81 ± 0,05	1,81 ± 0,13#	3,81 ± 0,19#	2,61 ± 0,16#	2,94 ± 0,15#	2,66 ± 0,16#
LPS, Gly	0,78 ± 0,05	0,92 ± 0,09	1,63 ± 0,16	3,05 ± 0,23*	1,84 ± 0,08*	2,70 ± 0,11	2,77 ± 0,28
LPS, Pyr	0,80 ± 0,07	1,16 ± 0,08*	2,00 ± 0,27	3,52 ± 0,35	2,72 ± 0,27	3,63 ± 0,12	3,32 ± 0,21
LPS, Res	0,73 ± 0,10	0,73 ± 0,08	1,67 ± 0,19	2,40 ± 0,23*	1,97 ± 0,17*	2,47 ± 0,28*	2,42 ± 0,07
LPS, Nit	0,70 ± 0,00	0,70 ± 0,06	1,48 ± 0,24	2,57 ± 0,32*	2,02 ± 0,12*	2,36 ± 0,10*	2,82 ± 0,48

Glycin (LPS, Gly; 20 mg/kg × h⁻¹), Natrium-Pyruvat (LPS, Pyr; 50 mg/kg × h⁻¹), Resveratrol (LPS, Res; 60 µg/kg × h⁻¹), Natrium-Nitrit (LPS, Nit; 40 µg/kg × h⁻¹) oder reine 0.9 % NaCl-Lösung (in der NaCl-Kontrolle, NaCl-Ktrl. und die der LPS-Kontrollgruppe, LPS-Ktrl.) wurden kontinuierlich infundiert (7 ml/kg × h⁻¹), beginnend 30 Minuten vor der LPS-Injektion (2.5 mg/kg). Die Werte wurden in Vollblut gemessen, das unmittelbar nach der Katheterisierung (erste Blutprobe vor der Perfusion der Testsubstanzen), vor der LPS-Applikation (30 Minuten nach Perfusionsbeginn der Testsubstanzen) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der LPS-Gabe abgenommen wurde. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM, n = 6. #p < 0.05 (vs. NaCl-Ktrl.), *p < 0.05 (vs. LPS-Ktrl.).

3.2.8. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierte Freisetzung von Markerenzymen sowie den Anstieg der Kreatinin- und freien Hämoglobinkonzentration im Plasma

Die Aktivitäten der LDH, GPT, GOT und CK-NAC, sowie die Konzentrationen von Kreatinin und freiem Hämoglobin im Plasma änderten sich in der NaCl-Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant (Abb. 3.12). Die Applikation von LPS führte zu einer starken Erhöhung aller Parameter. So stieg die LDH-Aktivität in der LPS-Kontrollgruppe kontinuierlich von 83 ± 11 U/l (unmittelbar vor der LPS-Gabe) auf 2.803 ± 317 U/l am Versuchsende an (Abb. 3.12A). Ebenfalls deutlich in dieser Gruppe war der Anstieg der GPT-Aktivität von 54,7 ± 3,1 U/l vor der LPS-Injektion auf 303,7 ± 40,4 U/l am Versuchsende 300

Minuten nach der Injektion von LPS (Abb. 3.12B). Auch die GOT-Aktivität stieg im gleichen Zeitraum signifikant von 64 ± 5 U/l auf 1.000 ± 106 U/l an (Abb. 3.12C). Die CK-NAC-Aktivität sowie die Kreatininkonzentration im Plasma erhöhten sich signifikant von 184 ± 22 U/l auf 3417 ± 551 U/l bzw. von $0,55 \pm 0,02$ mg/dl vor auf $1,48 \pm 0,04$ mg/dl 300 Minuten nach der LPS-Injektion. Weder Glycin noch Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit beeinflussten diese Parameter in dem Zeitraum vor der LPS-Injektion. Der LPS-induzierte Anstieg der LDH-Aktivität wurde durch alle untersuchten Substanzen signifikant vermindert (Abb. 3.12A). In den 120 Minuten nach der LPS-Injektion entnommenen Plasmaproben waren die Aktivitäten in der Resveratrol- (541 ± 56 U/l) und der Nitrit-Gruppe (579 ± 101 U/l) bereits signifikant niedriger als in der LPS-Kontrollgruppe (1.010 ± 120 U/l). Am Versuchsende war die LDH-Aktivität in allen Schutzstoffgruppen (Glycin: 1.836 ± 314 U/l; Pyruvat: 1.874 ± 175 U/l; Resveratrol: 1.718 ± 214 U/l; Nitrit: 1.379 ± 233 U/l) signifikant unter dem Wert der LPS-Kontrolle (2.803 ± 317 U/l). Die Aktivitäten der auf Schädigungen der Leber hinweisenden Transaminasen GPT und GOT wurden signifikant durch die Infusion von Glycin und Nitrit vermindert (Abb. 3.12B-C). Die mit diesen Schutzstoffen behandelten Tiere lagen am Versuchsende mit einer GPT-Aktivität von 205 ± 34 U/l (Glycin) und 153 ± 19 U/l (Nitrit) signifikant unterhalb der LPS-Kontrollgruppe mit 304 ± 40 U/l. Die GOT-Aktivität am Versuchsende war in der Glycin- (674 ± 108 U/l), Nitrit- (495 ± 70 U/l) und der Resveratrol-Gruppe (672 ± 93 U/l) signifikant unter dem Niveau der LPS-Kontrollgruppe (1.000 ± 106 U/l; Abb. 3.12C). Ein Schutz der Nierenfunktion vor der LPS-induzierten Schädigung zeigte sich 300 Minuten nach der Injektion von LPS anhand eines deutlich verminderten Kreatininspiegels in den mit Glycin und Resveratrol behandelten Gruppen (Abb. 3.12D). Im Vergleich zur LPS-Kontrolle mit einer Kreatininkonzentration von $1,48 \pm 0,04$ mg/dl waren die Werte in allen Schutzstoffgruppen deutlich niedriger, wobei dieser Effekt aber nur für Glycin ($1,12 \pm 0,09$ mg/dl) und Resveratrol ($1,16 \pm 0,09$ mg/dl) signifikant war.

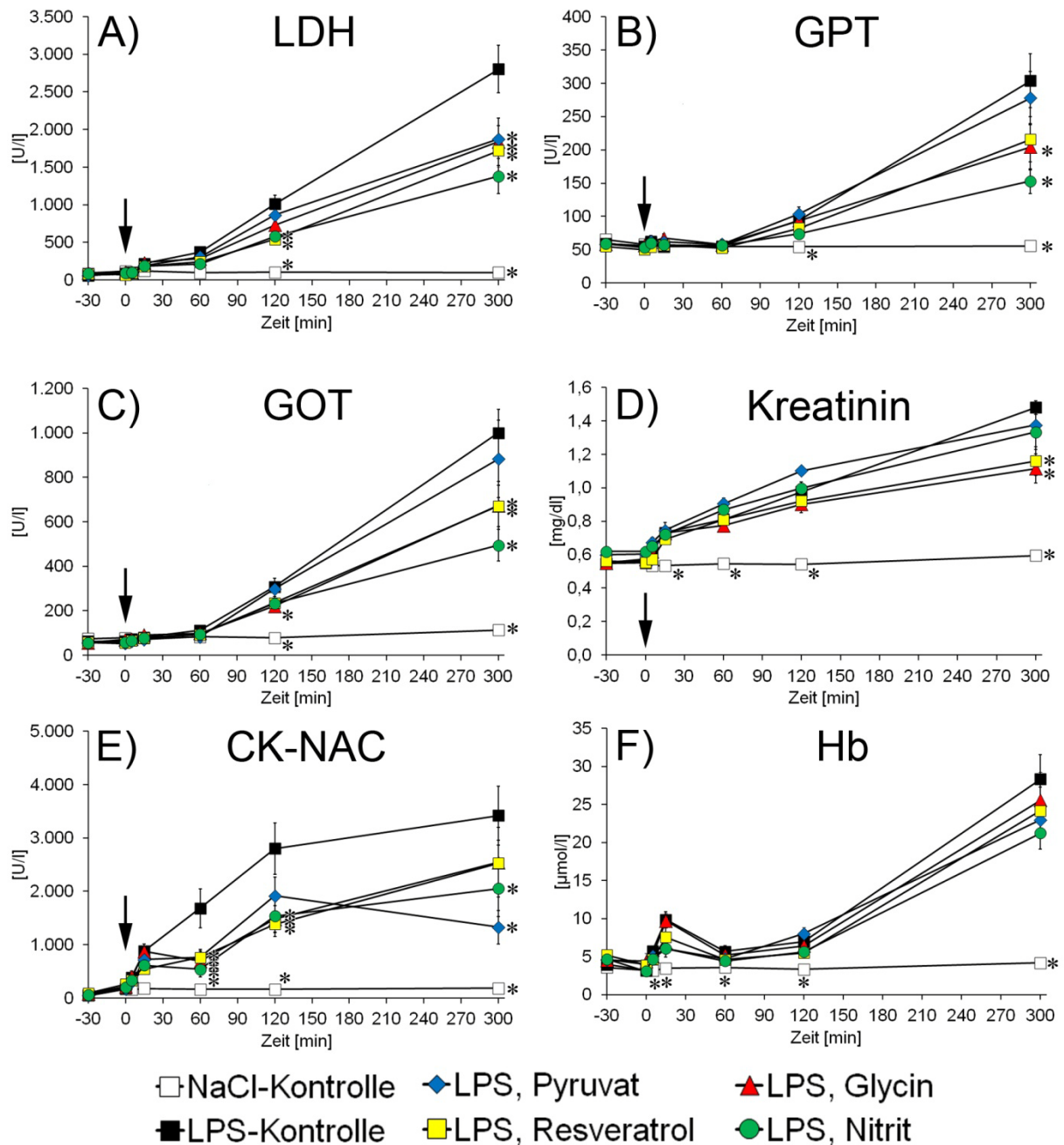


Abb. 3.12: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die LPS-induzierte Freisetzung von Markerenzymen sowie die Erhöhung der Kreatinin- und Hb-Konzentration im Plasma. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten bevor LPS (2.5 mg/kg) injiziert wurde (1 ml/kg ; Pfeile). Tiere der LPS-Kontrollgruppe und NaCl-Kontrollgruppe (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0.9% NaCl-Lösung. Die Aktivitäten der Laktat-Dehydrogenase (LDH, A), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, B), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, C) und der Creatin-Kinase (CK-NAC, E), sowie die Konzentrationen von Kreatinin (D) und freiem Hämoglobin (Hb, F) wurden im Plasma unmittelbar nach der Katheterisierung, vor der LPS-Injektion und 5, 15, 60, 120 und 300 Minuten danach bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$. Nicht sichtbare SEM-Werte werden durch die Symbole verdeckt. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrollgruppe).

Der durch LPS vermittelte Anstieg der CK-NAC-Aktivität im Plasma, der auf eine Schädigung der Muskulatur hindeutet, wurde schon ab der frühen Phase nach der LPS-Applikation durch alle vier Substanzen signifikant vermindert (Abb. 3.12E). 60 Minuten nach der LPS-Gabe lagen die Werte aller mit den Schutzstoffen behandelten Gruppen mit 693 ± 122 U/l (Glycin), 761 ± 147 (Pyruvat), 762 ± 114 U/l (Resveratrol) und 537 ± 142 U/l (Nitrit) signifikant unterhalb von denen der LPS-Kontrolle mit 1.683 ± 363 U/l.

Am Versuchsende war die CK-NAC-Aktivität in allen Schutzstoffgruppen deutlich geringer als in der LPS-Kontrollgruppe (3.417 ± 551 U/l), signifikant war dies aber nur bei den mit Pyruvat (1.329 ± 316 U/l) und Nitrit (2.050 ± 521 U/l) behandelten Tieren. Die Hb-Konzentration im Plasma der NaCl-Kontrollgruppe blieb über den gesamten Versuchszeitraum zwischen $3,14 \pm 0,13$ und $4,15 \pm 0,45$ $\mu\text{mol/l}$ nahezu konstant (Abb. 3.12F). Eine durch LPS hervorgerufene Hämolyse, angezeigt durch erhöhte Hb-Konzentrationen im Plasma, zeichnete sich bereits 5 Minuten nach der LPS-Injektion ab. Zu diesem Zeitpunkt waren die Werte der LPS-Kontrollgruppe mit $5,72 \pm 0,44$ $\mu\text{mol/l}$ schon signifikant höher als die der Tiere der NaCl-Kontrollgruppe ($3,14 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/l}$) und stiegen bis zum Versuchsende noch weiter an. Nach einem kurzen Peak 15 Minuten nach der LPS-Applikation fiel die Hb-Konzentration in der LPS-Kontrollgruppe zunächst wieder ab, um sich dann in dem Zeitraum zwischen 120 und 300 Minuten nach der LPS-Gabe zu vervierfachen. Die LPS-induzierte Hämolyse wurde durch keine der vier Substanzen signifikant beeinflusst. Die Aktivität der Pankreas-Amylase – gemessen im Plasma der finalen Blutentnahme – zeigte einen geringen Anstieg von 1.666 ± 168 U/l (NaCl-Kontrolle) auf 1.957 ± 136 U/l (LPS-Kontrolle; nicht dargestellt). Die Infusion von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte darauf keinen signifikanten Einfluss.

3.2.9. Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf die lipopolysaccharid-induzierten Veränderungen der Zytokinspiegel im Plasma

Im Plasma der NaCl-Kontrolltiere kam es über den gesamten Versuchszeitraum zu keinen Veränderung in den Konzentrationen von IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α (Abb. 3.13) sowie von IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-13 und GM-CSF (nicht gezeigt). Die Injektion von LPS führte bei allen in Abb. 3.13 gezeigten Zytokinen zu einem deutlichen Anstieg ihrer Konzentration im Plasma.

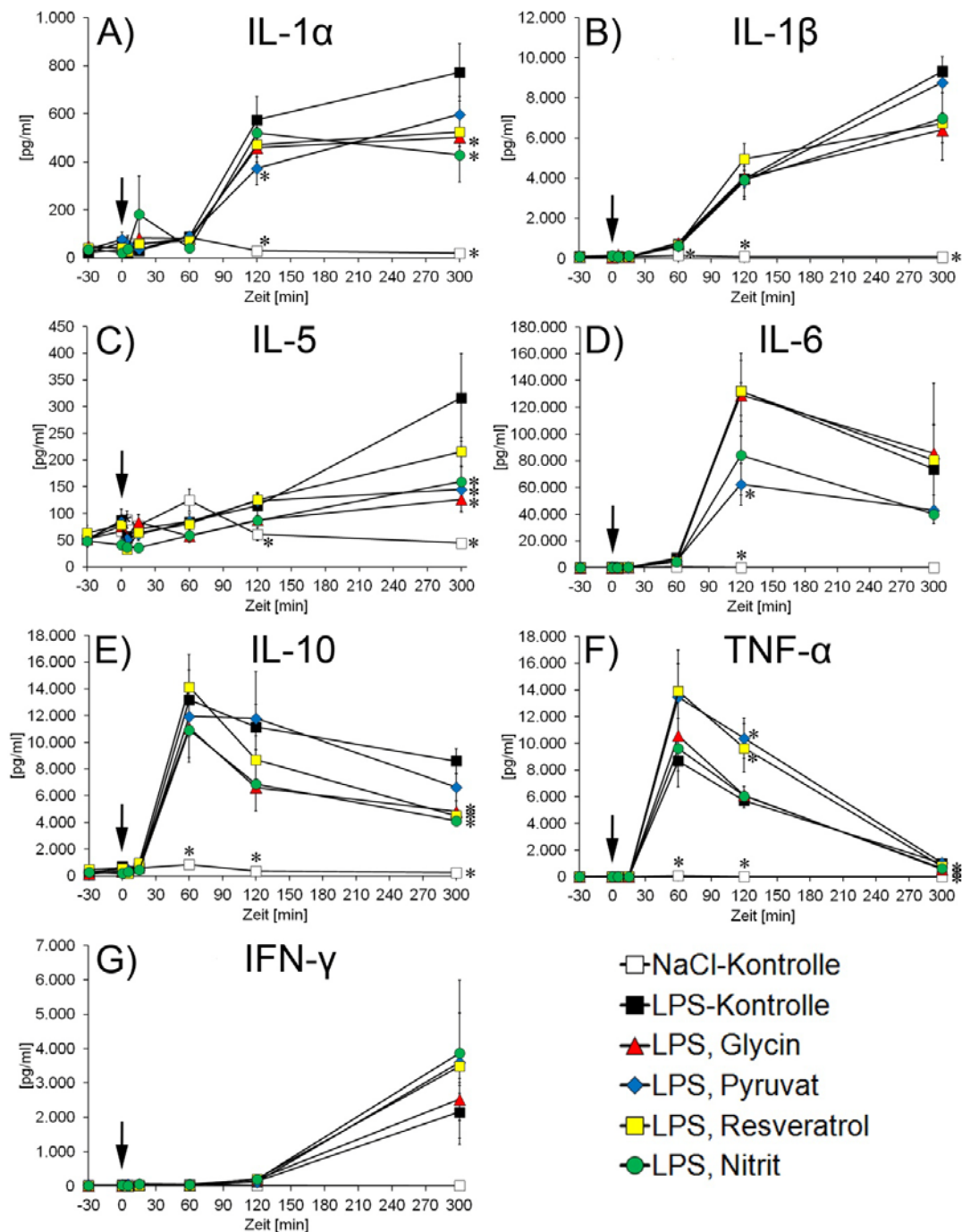


Abb. 3.13: Effekte von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit auf den Verlauf der LPS-induzierten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen im Plasma der Ratte. Glycin ($20 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Natrium-Pyruvat ($50 \text{ mg/kg} \times \text{h}^{-1}$), Resveratrol ($60 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) oder Natrium-Nitrit ($40 \mu\text{g/kg} \times \text{h}^{-1}$) wurden kontinuierlich infundiert ($7 \text{ ml/kg} \times \text{h}^{-1}$), beginnend 30 Minuten vor der LPS-Injektion (2.5 mg/kg , Pfeile). Tiere der LPS-Kontrolle und NaCl-Kontrolle (keine LPS-Injektion) erhielten die gleichen Volumina 0.9%iger NaCl-Lösung (1 ml/kg als Bolus). Die Konzentrationen von IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-5 (C), IL-6 (D), IL-10 (E), TNF- α (F) und IFN- γ (G) wurden im Plasma des Blutes bestimmt, welches unmittelbar nach der Katheterisierung, vor der LPS-Gabe und 5, 15, 60, 120 und 300 Minuten danach entnommen wurde. Die gezeigten Konzentrationen sind Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$. Nicht sichtbare SEM-Werte sind durch die Symbole verdeckt. * $p < 0.05$ (vs. LPS-Kontrollgruppe).

IL-1 α stieg in der LPS-Kontrollgruppe 120 Minuten nach der LPS-Injektion signifikant von 66 ± 19 pg/ml (vor LPS-Gabe) auf 574 ± 98 pg/ml an und erreichte am Versuchsende eine Konzentration von 772 ± 119 pg/ml (Abb. 3.13A). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich auch bei IL-1 β und IL-5. So war die Konzentration von IL-1 β in Tieren der LPS-Kontrollgruppe bereits 60 Minuten nach der Injektion von LPS mit 700 ± 161 pg/ml signifikant über dem Wert der NaCl-Kontrollgruppe (155 ± 29 pg/ml) und stieg bis zum Versuchsende stetig auf 9.322 ± 736 pg/ml an (Abb. 3.13B).

IL-5 war in der LPS-Kontrollgruppe erst nach 120 Minuten signifikant erhöht ($114,6 \pm 23,4$ pg/ml) im Vergleich zu den nicht mit LPS behandelten Tieren ($61,2 \pm 12,1$ pg/ml) zum gleichen Zeitpunkt und stieg zum Versuchsende weiter auf $317,0 \pm 81,6$ pg/ml an (Abb. 3.13C). IL-6 erreichte seine höchste Konzentration 120 Minuten nach der LPS-Gabe (132.145 ± 22.836 pg/ml) und fiel zum Versuchsende hin wieder ab (73.737 ± 33.687 pg/ml; Abb. 3.13D). Die Zytokine IL-10 und TNF- α erreichten ihre höchste Konzentration in der LPS-Kontrollgruppe bereits 60 Minuten nach der Injektion von LPS (13.186 ± 1.086 bzw. 8.672 ± 1.919 pg/ml) und fielen zum Versuchsende wieder deutlich ab (8.595 ± 933 bzw. 1.023 ± 126 pg/ml; Abb. 3.13E/F). Im Fall von IFN- γ kam es erst zum Versuchsende zu einem deutlichen Anstieg, der aber nicht signifikant zur NaCl-Kontrollgruppe war: In den ersten 120 Minuten nach der LPS-Gabe war nur ein leichter Anstieg von 28 ± 11 pg/ml auf 133 ± 29 pg/ml messbar, am Versuchsende lag die Konzentration bei 2.156 ± 764 pg/ml (Abb. 3.13F). Die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-13 und GM-CSF blieben innerhalb der Schwankungen der NaCl-Kontrollgruppe bzw. änderten sich nicht signifikant (nicht gezeigt).

Die Infusion von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Zytokinkonzentrationen im Plasma während des Zeitraums vor der LPS-Injektion. Auch hatte keine der Substanzen einen Einfluss auf den LPS-induzierten Anstieg der Konzentrationen von IL-1 β und IFN- γ (Abb. 3.13B, G).

Die Konzentration von IL-6 war im Plasma der mit Pyruvat und Nitrit behandelten Tiere ab der 120. Minute nach LPS-Gabe vermindert (Abb. 3.13D); dieser Effekt war aber nur im Falle von Pyruvat zum Zeitpunkt 120 Minuten nach der LPS-Applikation signifikant. Die Konzentrationen der übrigen Zytokine wurden, falls überhaupt, fast ausschließlich in der späten Phase des Experiments (≥ 120 Minuten) nach der LPS-Injektion durch die Testsubstanzen beeinflusst. So war die IL-1 α -Konzentration am Versuchsende bei den mit Glycin (502 ± 28 pg/ml) und Nitrit (428 ± 112 pg/ml) behandelten Tieren signifikant niedriger als in der LPS-Kontrollgruppe

(772 ± 119 pg/ml). Temporär (120 Minuten nach LPS-Gabe) zeigte sich auch bei den mit Pyruvat infundierten Tieren mit 374 ± 70 pg/ml eine signifikant verminderte IL-1 α -Konzentration im Vergleich zur LPS-Kontrolle (574 ± 98 pg/ml; Abb. 3.13A). Mit Ausnahme von Resveratrol hatten alle getesteten Substanzen einen signifikant mindernden Effekt auf die IL-5-Konzentrationen im Plasma (Abb. 3.13C) und hatten mit $126,3 \pm 4,6$ pg/ml (Glycin), $145,0 \pm 42,5$ pg/ml (Pyruvat) und $159,8 \pm 56,4$ pg/ml (Nitrit) am Versuchsende nur etwa halb so hohe Konzentrationen wie in der LPS-Kontrollgruppe ($317,0 \pm 81,6$ pg/ml). Die Abnahme der IL-10-Konzentration nach dessen anfänglich sehr starkem Anstieg wurde bei den mit Glycin, Resveratrol oder Nitrit behandelten Tieren beschleunigt und am Versuchsende waren die gemessenen Werte mit 4.819 ± 798 pg/ml (Glycin), 4.514 ± 495 pg/ml (Resveratrol) und 4.132 ± 211 pg/ml (Nitrit) signifikant niedriger als in Tieren der LPS-Kontrollgruppe (8.595 ± 933 pg/ml; Abb. 3.13E). Im Falle von TNF- α führte die Infusion von Pyruvat und Resveratrol zu einem erhöhten Anstieg des Zytokins 60 bis 120 Minuten nach der LPS-Injektion im Plasma. Dieser Effekt war zum Zeitpunkt von 120 Minuten nach der LPS-Gabe signifikant für Pyruvat (10.377 ± 1.522 pg/ml) und Resveratrol (9.648 ± 1.820 pg/ml) gegenüber der LPS-Kontrolle (5.716 ± 529 pg/ml; Abb. 3.13F). Am Versuchsende zeigten mit Pyruvat und Resveratrol behandelte Tiere keine signifikant veränderte TNF- α -Konzentration im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell zur Induktion eines akuten inflammatorischen Schocks durch die Bolus-Injektion von LPS etabliert, das sich durch eine gute Reproduzierbarkeit auszeichnet und durch die zahlreichen gemessenen Parameter einen umfassenden Überblick über die Vitalparameter, die Entzündungsreaktion und die schockbedingte Gewebeschädigung ermöglicht. Dabei zeigte sich, dass bereits eine Dosis von 2,5 mg LPS/kg eine nahezu maximale Schädigung in den untersuchten Parametern auslöst, die durch höhere Dosierungen nicht signifikant gesteigert werden kann.

In weiterführenden Untersuchungen konnten gute Schutzwirkungen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit vor den Auswirkungen des LPS-induzierten Schocks nachgewiesen werden. Die Auswirkungen auf das Zytokinnetzwerk waren dagegen sehr inkonsistent und können die protektiven Eigenschaften der getesteten Substanzen nicht erklären.

4.1. Systemische Parameter und Schutzstoffeffekte im akuten lipopolysaccharid-induzierten Schock der Ratte

Der schon wenige Minuten nach der LPS-Injektion auftretende systemische Blutdruckabfall (Hypotension; Abb. 3.1A und 3.11A) ist wahrscheinlich auf die NO-Bildung durch die LPS-bedingte Aktivierung der eNOS zurückzuführen. Diese bewirkt durch eine vermehrte NO-Bildung eine Vasodilatation und somit den initialen Fall im Blutdruck. In der frühen Phase nach der LPS-Gabe kann die iNOS, die im Vergleich zur eNOS sehr viel größere NO-Mengen zur Immunabwehr bilden kann, noch nicht in ausreichender Quantität vorhanden sein, da sie zunächst noch exprimiert werden muss und dieser Vorgang deutlich mehr Zeit beansprucht. Zu diesem Schluss kamen auch Szabo *et al.* (Szabo *et al.*, 1993), die ebenfalls eine Hypotension kurz nach der LPS-Injektion (10 mg/kg i. v.) bei Ratten beobachteten. Eine weitere, in der Literatur diskutierte Ursache für die frühe Hypotension ist eine LPS-induzierte Stimulation des *Nervus vagus* (Yilmaz *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007). Die Aktivierung des Vagus-Nervs führt in der Regel zu einer Senkung des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Da in der vorliegenden Arbeit in den mit LPS behandelten Tieren die Herzfrequenz nach der LPS-Applikation deutlich anstieg (Abb. 3.1B, 3.11B), ist die frühe Hypotension wahrscheinlich nicht auf eine vagale Stimulation zurückzuführen. Keine der vier

getesteten Substanzen hatte einen signifikanten Effekt auf die initiale Hypotension kurz nach der Injektion von LPS, aber über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet verbesserten Pyruvat, Resveratrol und Nitrit den MAP signifikant (Abb. 3.11A). Welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist, bleibt offen. Die in dem am Versuchsende entnommenen Plasma gemessene Nitrit + Nitrat-Konzentration (Abb. 3.8B) zeigte sich durch keine der Testsubstanzen signifikant erniedrigt. Vermutlich stammt das final gemessene NO von der iNOS, die offensichtlich nicht durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit gehemmt worden ist. Insgesamt deutet somit nichts auf eine Hemmung der NO-Bildung durch die Substanzen hin.

Die Blutgasanalysen haben gezeigt, dass alle Parameter, die eine metabolische Azidose und Gewebeischämie widerspiegeln, deutlich durch die vier Substanzen verbessert wurden (Tab. 3.3). So waren in den mit Glycin behandelten Tieren die Werte des BE, des Standardbicarbonats und zeitweise auch des Laktats signifikant optimiert. Auch Resveratrol und Nitrit hatten einen positiven Effekt auf den BE, die Standardbicarbonat- und Laktat-Konzentration sowie zeitweise auch auf den pH im Blut. Außerdem waren in den mit Pyruvat behandelten Tieren der pH, der BE und das Standardbicarbonat signifikant höher im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe (Tab. 3.3). Schon vor der LPS-Injektion wurde in den mit Pyruvat behandelten Ratten eine erhöhte Laktat-Konzentration im Blut gemessen, was dafür spricht, dass das Pyruvat zu Laktat reduziert wurde (Tab. 3.2). Zusammen mit dem mitochondrialen oxidativen Pyruvatmetabolismus, der Wasserstoffionen verbraucht, könnten beide Mechanismen zur Verminderung der zellulären Azidose beigetragen haben (Karetzky & Cain, 1969; Zhou, 2005).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell bewirkte die Applikation von LPS neben einer Hypotension offenbar auch ein akutes Atemnotsyndrom („Acute Respiratory Distress Syndrome“, ARDS), was sich in einem drastischen Abfall des arteriellen P_{O_2} widerspiegelte (Tab. 3.3). Beim ARDS kommt es in der Lunge, bedingt durch einen übermäßigen inflammatorischen Prozess, zur Schädigung des alveolären Epithels und vaskulären Endothels und somit zu einer Zunahme der vaskulären Permeabilität. Dadurch wird das Organ mit einer proteinreichen Flüssigkeit geflutet (Dushianthan et al., 2011). Vermutlich bedingt durch den niedrigen pH-Wert (Azidose) war die Atemfrequenz (Abb. 3.11C) deutlich erhöht. Da der P_{O_2} trotz seines starken Abfalls nach der LPS-Injektion aufgrund der Beatmung mit 100%igem Sauerstoff immer noch im physiologischen Bereich lag und auch der P_{CO_2} in allen mit LPS-behandelten Tieren nicht signifikant erhöht, sondern eher

erniedrigt war, können diese beiden Parameter den Anstieg in der Atemfrequenz nicht erklären (Tab. 3.3). Keine der Testsubstanzen hatte auf den Verlauf der Atemfrequenz einen signifikanten Effekt. Die Abnahme des P_{O_2} wurde in der frühen Phase nach der LPS-Applikation signifikant durch Resveratrol und Nitrit vermindert, was keine Auswirkungen auf die durch LPS erhöhte Atemfrequenz hatte. Da beide Substanzen keinen senkenden Einfluss auf die in der Lunge gemessenen Zytokine hatten (Abb. 3.9) und Resveratrol die Konzentration von IL-1 α und IL-2 sogar noch signifikant erhöhte (Abb. 3.9A und C), kann ihr Effekt auf den P_{O_2} nicht mit einer Hemmung der Inflammation in der Lunge erklärt werden. Paradoxerweise wurde die Einwanderung von Granulozyten in das Lungengewebe durch Resveratrol signifikant gesenkt (Tab. 3.2). Protektive Eigenschaften von Resveratrol hinsichtlich der milderen Form des ARDS, der „Acute Lung Injury“ (ALI), wurden bereits an einem LPS-Modell mit Mäusen gezeigt (Cao et al., 2011). Die Autoren fanden eine signifikant reduzierte NF- κ B-Aktivität, eine Verringerung der IL-1 β -mRNA-Spiegel im Lungengewebe sowie eine Verbesserung des Nass-Trocken-Indexes der Lunge bei mit Resveratrol (1 oder 25 mg/kg *per os* über 3 Tage) behandelten Mäusen und postulierten, dass Resveratrol aufgrund einer Hemmung der Inflammation protektiv wirkt. In der vorliegenden Arbeit scheint der Mechanismus der Protektion allerdings ein anderer zu sein, da die Zytokinspiegel im Lungengewebe durch Resveratrol primär erhöht wurden. Dies mag mit der unterschiedlichen Form der Applikation und Dosis zu erklären sein.

Die Injektion von LPS führte bereits nach kurzer Zeit zu einem signifikanten Anstieg des Hb und des Hämatokrits (Tab. 3.1 und 3.3), was für einen transendothelialen Flüssigkeitsübertritt in das Interstitium („cappillary leak syndrom“) spricht. Dies deutet auf eine Störung der vaskulären Barriere (Schrakenstörung) hin, die lediglich durch Resveratrol innerhalb der ersten 15 Minuten nach der Gabe von LPS signifikant vermindert wurde.

Die LPS-bedingten Veränderungen der Elektrolytkonzentrationen im Blutplasma wurden nur temporär signifikant durch die Substanzen beeinflusst (Tab. 3.3). Erwähnenswert ist hierbei vor allem der in den mit Pyruvat behandelten Tieren deutlich erhöhte Na⁺-Spiegel am Versuchsende, was sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass Natriumpyruvat appliziert wurde.

4.2. Protektion vor der lipopolysaccharid-induzierten Gewebeschädigung

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass beim akuten LPS-induzierten Schock der Ratte im Verlauf einer Beobachtungsphase von 300 Minuten nur geringe histologische Veränderungen auftreten (Abb. 3.6 und 3.7A). Histopathologische Anzeichen für Organschädigungen waren im Herzen und in der Lunge nicht bzw. im Dünndarmgewebe, in der Niere sowie in der Leber kaum nachweisbar. Aus diesem Grund war sehr wahrscheinlich auch keine signifikante Verbesserung der histologischen Architektur durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit detektierbar. Vermutlich waren die Dauer der Schockphase und der anschließende Versuchszeitraum insgesamt zu kurz, um ausgeprägte histologische Veränderungen in den Organen auszulösen. Die Bildung entzündlicher Infiltrate in der Leber (Abb. 3.7B) und die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Niere, die Leber, die Lunge, das Herz und das Dünndarmgewebe (Tab. 3.2) erwiesen sich als die aussagekräftigsten histologischen Parameter. Die Plasmamarker der Organschädigung und ihrer Funktion (Abb. 3.12) waren die wichtigsten Indikatoren der LPS-induzierten Zell- und Gewebeschädigung. Die Infusionen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol oder Nitrit führten zu deutlichen positiven Effekten auf diese Parameter. So bewirkte die Aminosäure Glycin einen geringeren Anstieg in der LDH-, GPT-, GOT- und CK-Aktivität sowie der Kreatininkonzentration im Plasma. Ebenso verbesserten auch Pyruvat (LDH, CK-NAC), Resveratrol (LDH, GOT, CK-NAC, Kreatinin) und Nitrit (LDH, GPT, CK-NAC) signifikant einige dieser Parameter. Keine der Substanzen verminderte allerdings den LPS-induzierten Anstieg der Hämolyserate (Abb. 3.8A und 3.12F). In der Literatur werden diverse Ursachen für das Auftreten einer Hämolyse in der Sepsis postuliert. Zum einen sollen einige Pathogene in der Lage sein, Hämolyse mittels Toxinen zu induzieren (Aroian & van der Goot, 2007; Gonzalez et al., 2008), zum anderen können durch die septische Verbrauchskoagulopathie entstandene Fibrinstränge die Erythrozyten mechanisch beschädigen und zur sogenannten Schistozytenbildung führen (Bull & Kuhn, 1970; Heyes et al., 1976). Des Weiteren kann die Hämolyse durch ein aktiviertes Komplementsystem (Ehrnthaller et al., 2011) oder die Zerstörung der Erythrozyten mittels LPS-induzierter Veränderung ihrer Membraneigenschaften (Pöschl et al., 2003) ausgelöst worden sein. Auch die Eryptose, ein der Apoptose ähnelnder Mechanismus, wird als mögliche Ursache sepsisbedingter Hämolyse diskutiert (Lang et al., 2010). Welcher der oben aufgeführten Mechanismen letztendlich für das

Auftreten der Hämolyse in der vorliegenden Arbeit verantwortlich ist, bleibt ungeklärt. Jedoch scheinen weder Glycin noch Pyruvat, Resveratrol und Nitrit einen Einfluss auf diese Schädigungsmechanismen zu haben. Basierend auf den gemessenen Plasmaenzymaktivitäten zeigten Glycin und Nitrit ein etwas höheres protektives Potenzial als Pyruvat und Resveratrol. Betrachtet man die im finalen Plasma (300 Minuten nach LPS-Injektion) gemessenen Enzymaktivitäten, so konnte Glycin signifikant die Aktivität der GOT, der GPT sowie der LDH und die Kreatininkonzentration im Plasma der Tiere senken. Nitrit führte zu signifikant niedrigeren Aktivitäten aller gemessener Enzyme (CK-NAC, GOT, GPT und LDH), Resveratrol hatte signifikant mindernden Effekt auf die Aktivität von GOT und LDH sowie der Kreatininkonzentration. Die mit Pyruvat infundierten Tiere zeigten eine signifikant niedrigere Aktivität der Enzyme CK-NAC und LDH in den am Ende der Versuche entnommenen Proben. Zusammenfassend zeigten Glycin, Resveratrol und Nitrit, in Einklang mit früheren Studien (Bruck et al., 2003; Cauwels et al., 2009; Sebai et al., 2010) und als neue Erkenntnis Natrium-Pyruvat, einen deutlich messbaren Zell- und Gewebeschutz im akuten LPS-induzierten Schock. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass direkte Vergleiche der vier Schutzstoffe nicht unproblematisch sind, da stark unterschiedliche Dosierungen eingesetzt worden sind und keine direkte Dosis-Wirkungsabhängigkeit untersucht ist.

4.3. Anti-inflammatorische Eigenschaften von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit im akuten lipopolysaccharid-induzierten Schock

In früheren Studien zum Endotoxinschock bei Ratten und Mäusen wurde gezeigt, dass Glycin die Aktivierung der Kupfferzellen (residenter Makrophagen in der Leber) und anderer Immunzellen hemmen kann, was unter anderem zu verringerten TNF- α -Spiegeln führte (Xu et al., 2008; Ikejima et al., 1996). In diesen Studien – die Tiere wurden mit einer Glycindiät (5 % über 3 Tage) gefüttert – waren die TNF- α -Spiegel im Serum über die gesamte Versuchsdauer reduziert. Es wurde postuliert, dass Glycin die LPS-induzierte Organschädigung und Mortalität durch eine Senkung der toxischen Kupfferzellprodukte verringert. In der vorliegenden Arbeit hatte die Infusion von Glycin (20 mg/kg \times h) nur geringe Effekte auf die durch LPS induzierte inflammatorische Antwort, d. h. die Plasmakonzentrationen des pro-inflammatorischen IL-1 α , IL-5 und TNF- α sowie des anti-inflammatorischen IL-10 wurden leicht gesenkt (Abb. 3.13A, C, E, G) und die kumulative Nitrit + Nitrat-

Konzentration, als Maß für die NO-Freisetzung, nicht vermindert (Abb. 3.8B). Der fehlende Effekt auf die Nitrit + Nitrat-Konzentration suggeriert, dass die NF- κ B-abhängige iNOS-Expression durch die Infusion von Glycin nicht beeinflusst wurde. Eindeutige Effekte auf die Zytokinspiegel in den Organen waren hauptsächlich auf die Absenkung der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine im Herzen und einiger Zytokine im Dünndarmgewebe begrenzt (Abb. 3.9). In der Leber wurde die TNF- α -Konzentration nicht signifikant gesenkt, obwohl die Granulozyten-Einwanderung in der Leber signifikant durch Glycin vermindert wurde (Abb. 3.7B). Die für die Senkung bestimmter Zytokinspiegel durch Glycin verantwortlichen Mechanismen bleiben unklar. Unterschiede in der Glycin-Dosis und der Art der Verabreichung erklären möglicherweise, weshalb in der vorliegenden Arbeit die TNF- α -Konzentration in der Leber nicht beeinflusst wurde und sie im Plasma der mit Glycin behandelten Tiere lediglich am Versuchsende vermindert war, d. h. zu einem Zeitpunkt, als die TNF- α -Konzentration schon auf weniger als 10 % der höchsten Plasmakonzentration abgefallen war (Abb. 3.13G). Aufgrund der geringen Dosis, mit der Glycin hier infundiert wurde, und im Hinblick auf die IC₅₀-Werte für die glycinrezeptorabhängige Inhibierung der Entzündungszellenaktivierung (Petrat et al., 2011a; Petrat et al., 2011b) war die Glycinkonzentration im Blutplasma wahrscheinlich zu gering, um maßgeblich die rezeptorabhängige inflammatorische Zytokinfreisetzung zu inhibieren. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Hemmung der inflammatorischen Zytokinfreisetzung kaum für die positiven Effekte des intravenös verabreichten Glycins auf die systemischen Parameter, die Granulozyteninfiltration und Gewebeschädigung im akuten LPS-induzierten Schock verantwortlich sein kann.

In einem Schlaganfall-Modell beschreiben Wang et al. eine jeweils verringerte Inflammation und Aktivierung von NF- κ B in mit Natrium-Pyruvat (500 mg/kg, i. p.) behandelten Ratten (Wang et al., 2009). Die Autoren schlussfolgerten, dass Pyruvat das Gewebe möglicherweise durch eine Inflammationsblockade vor den Folgen der Ischämie schützt. Zu beachten ist, dass sich alle anderen Berichte über die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Pyruvat tatsächlich auf Ethyl-Pyruvat beziehen, dessen pharmakologische Wirkungen sich jedoch von denen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Natrium-Pyruvates unterscheiden (Fink, 2008; Fink, 2007). Die Infusion von Natrium-Pyruvat (50 mg/kg \times h) reduzierte am effektivsten die Konzentrationen verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α im Dünndarmgewebe, in der Niere, der Leber und der Lunge, gleichzeitig aber auch die

der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 in der Niere und der Lunge und IL-10 in Dünndarm, Niere und Leber (Abb. 3.9). Darüber hinaus verminderte nur Glycin die erhöhten Zytokinspiegel im Herzen effektiver als Pyruvat. In Übereinstimmung mit dem hemmenden Effekt von Pyruvat auf die LPS-abhängige Zytokin-Antwort in der Leber, wurde auch die Einwanderung entzündlicher Infiltrate in diesem Organ signifikant vermindert (Abb. 3.7B und Tab. 3.2). Relativ gering war dagegen der positive Effekt von Pyruvat auf die Plasmakonzentrationen der Zytokine. IL-5 und zeitweise IL-1 β sowie IL-6 waren im Plasma der mit Pyruvat behandelten Tiere im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe vermindert. Die Konzentration von TNF- α war allerdings sogar zeitweise erhöht (Abb. 3.13F). Auch die Nitrit + Nitrat-Konzentration im finalen Plasma als Indikator für die NO-Bildung wurde darüber hinaus nicht durch Pyruvat verringert (Abb. 3.8B). Die positiven Wirkungen von Pyruvat auf die inflammatorische Zytokin-Antwort und die Granulozyteninfiltration in der Leber, die sich in der vorliegenden Arbeit herausstellten, scheinen die Schlussfolgerung von Wang et al. (Wang et al., 2009) zu bestätigen. Allerdings wurde die Freisetzung der Transaminasen, als Parameter der Leberschädigung, in der vorliegenden Arbeit nicht durch Pyruvat verringert. Außerdem erhöhte es die TNF- α Konzentration im Plasma und sein gewebeprotectives Potenzial war dem der anderen Substanzen nicht überlegen. Zusammenfassend waren die vorteilhaften Effekte von Pyruvat auf die LPS-induzierte Erhöhung der Zytokinspiegel in der Leber im Einklang mit der verminderten Granulozyteninfiltration in diesem Organ. Allerdings scheint die Hemmung der Entzündungsreaktion nicht generell notwendig für die Verbesserung der systemischen Parameter und den Schutz vor der LPS-induzierten Gewebeschädigung durch Pyruvat zu sein.

In Studien mit verschiedenen Zelllinien zeigte Resveratrol (20-100 μ M) eine Inhibierung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B (Panaro et al., 2011; Capiralla et al., 2012). Auch in Arbeiten mit einem Mausmodell zur LPS-induzierten akuten Lungenschädigung wurde über die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Resveratrol (1 oder 25 mg/kg per os pro Tag über 3 Tage) berichtet (Reduktion der mRNA-Konzentration von IL-1 β in der Lunge (Cao et al., 2011)). Im Gegensatz dazu hatte Resveratrol (50 mg/kg \times Tag, Zwangsernährung über 3 Tage) keinen Effekt auf die LPS-induzierten Veränderungen der IL-1 β und TNF- α Spiegel in verschiedenen Organen (Milz, Lunge, Leber, Dün- und Dickdarm) sowie im Blutplasma von Ratten (Larrosa et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit hatte die Infusion von lediglich 60 μ g Resveratrol/kg \times h eindeutig eine verstärkende Wirkung auf die LPS-induzierte

Zytokinfreisetzung. Mit wenigen Ausnahmen wurden die Konzentrationen aller pro- und anti-inflammatorischen Zytokine im Dünndarmgewebe und der Leber (Abb. 3.9) durch Resveratrol zusätzlich signifikant erhöht, im Herzen das anti-inflammatorische IL-10 vermindert und im Plasma TNF- α zeitweise erhöht sowie IL-10 gesenkt (Abb. 3.13E, G). Allerdings hatte Resveratrol keinen Effekt auf die erhöhte Nitrit + Nitrat-Konzentration im Plasma (Abb. 3.8B). Im Einklang mit seiner pro-inflammatorischen Wirkung auf die Leberzytokine im LPS-induzierten Schock wurde die Bildung entzündlicher Infiltrate in diesem Organ anders als durch alle anderen Substanzen nicht verringert (Abb. 3.7B). Paradoxe Weise zeigte sich bei der Auszählung der neutrophilen Granulozyten in der Leber (Tab. 3.2) eine signifikant verminderte Anzahl im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe. Dies mag der Tatsache geschuldet sein, dass die entzündlichen Infiltrate nicht zwangsweise neutrophile Granulozyten in linearer Korrelation enthalten müssen. Trotzdem lässt sich zusammenfassend sagen, dass die pro-inflammatorische Wirkung von intravenös appliziertem Resveratrol auf die Zytokinfreisetzung im Gewebe und dem Plasma im Widerspruch zu den positiven Effekten des Polyphenols auf die systemischen Parameter und die der Gewebeschädigung im akuten LPS-induzierten Schock steht.

Da Nitrit in ischämischen Gewebearealen effektiver zu NO reduziert wird, kann es dort – wie unter Kapitel 1.3.4 beschrieben – als ortsspezifischer NO-Donor fungieren (Van Faassen et al., 2009). Daher werden die Effekte von Nitrit auf die Zytokinfreisetzung meist durch die inhibierende Wirkung von NO auf NF- κ B erklärt (Connelly et al., 2001; Katsuyama et al., 1998; Davies et al., 2003). Als weitere Konsequenz sollte zudem (indirekt) die NF- κ B-abhängige iNOS-Expression in Makrophagen sowie Endothelzellen und die damit verbundene NO-Bildung vermindert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die durch LPS induzierten Veränderungen in den Zytokinspiegeln der Organe kaum durch Nitrit (40 μ g Natrium-Nitrit/kg \times h) beeinflusst (Abb. 3.9). Lediglich zwei der pro-inflammatorischen Zytokine waren in mit Nitrit behandelten Tieren erhöht und nur insgesamt vier niedriger als in der LPS-Kontrollgruppe. Obwohl in der Leber der mit Nitrit behandelten Ratten nur die Konzentration von IL-2 im Vergleich zur LPS-Kontrollgruppe erniedrigt war, wurde die Bildung entzündlicher Infiltrate in diesem Organ gleichermaßen vermindert wie durch Pyruvat (Abb. 3.7B). Im Gegensatz zu diesem Befund ergab die Auszählung der neutrophilen Granulozyten in der Leber keine signifikante Änderung hinsichtlich ihrer Anzahl im Vergleich mit Tieren der

LPS-Kontrollgruppe. Wobei auch hier nochmals darauf hingewiesen sei, dass die entzündlichen Infiltrate nicht zwangsweise neutrophile Granulozyten in linearer Korrelation enthalten müssen. Auf die Plasmakonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-5 und TNF- α , aber auch auf das anti-inflammatorische IL-10 zeigte Nitrit eine senkende Wirkung (Abb. 3.13). Ob eine Hemmung von NF- κ B durch das aus Nitrit gebildete NO für diese Effekte verantwortlich ist, scheint fraglich, wenn man den starken LPS-induzierten Anstieg der Nitrit + Nitrat-Konzentration im Plasma mit dem zusätzlichen nicht signifikanten Konzentrationsanstieg bedingt durch die Nitrit-Infusion betrachtet (Abb. 3.8B). Allerdings können lokal positive Effekte auf die Mikrozirkulation nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend scheint eine Hemmung der inflammatorischen Zytokinfreisetzung nicht obligat für die positiven Effekte der Nitrit-Infusion auf die systemischen Parameter und die Gewebeschädigung im akuten LPS-induzierten Schock zu sein.

5. Zusammenfassung

Glycine, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit sind unter anderem bekannt für ihre protektiven Eigenschaften gegen ischämische Gewebeschädigung. Andererseits ist auch für alle Substanzen ein positiver Effekt auf die systemische Inflammation und die damit einhergehende Zytokinfreisetzung in der Literatur beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen dieser vier Substanzen auf den akuten LPS-induzierten Schock in der Ratte untersucht werden. Dabei stand die Fragestellung im Vordergrund, ob die Hemmung der inflammatorischen Zytokinfreisetzung durch Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit Grundvoraussetzung für ihre protektive Wirkung gegen Gewebeschädigung im LPS-Schock ist. Zu diesem Zweck musste zunächst ein Tiermodell etabliert werden, in welchem ein LPS-induzierter septischer Schock reproduzierbar simuliert und dabei eine möglichst tiefe Schockphase erreicht werden kann. Gleichzeitig sollte aber ein vorzeitiges Ableben der Tiere innerhalb des Versuchszeitraumes vermieden werden und der Schock-Stimulus musste so gewählt werden, dass er mögliche protektive oder auch schädigende Effekte der Testsubstanzen nicht durch einen zu tiefen Schockzustand der Tiere überlagert.

Für die Untersuchung der Effekte von Glycin, Natrium-Pyruvat, Resveratrol und Nitrit im LPS-Schock wurde anästhesierten Ratten ein intravenöser Bolus von 2,5 mg LPS/kg injiziert und die Tiere über einen Zeitraum von 300 Minuten beobachtet. Die vier Schutzstoffe wurden, beginnend 30 Minuten vor der LPS-Gabe, kontinuierlich infundiert; eine Kontrollgruppe erhielt zum Vergleich reine 0,9%ige NaCl-Lösung. In zwei konsekutiven Serien wurden zunächst die histopathologischen Veränderungen im Dünndarmgewebe, der Niere, der Leber, der Lunge und des Herzens sowie die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und die Zytokinspiegel in diesen Organen bestimmt. In finalen Plasmaproben wurden die Nitrit + Nitrat-Konzentration und freies Hämoglobin bestimmt sowie die Gerinnungsparameter und das Blutbild untersucht. In der zweiten Serie wurden Zeitverläufe der Zytokin-, Kreatinin- und der Hämoglobinkonzentrationen sowie der Markerenzymaktivitäten im Plasma gemessen. Außerdem wurden die Vital- und Blutgasparameter ausgewertet. Dabei zeigten sowohl Glycin als auch Pyruvat, Resveratrol und Nitrit eine Verbesserung des arteriellen Blutdrucks und von Parametern wie pH-Wert und BE, die eine Gewebeischämie widerspiegeln. So wurden auch die Plasmamarker der

Organschädigung durch alle Substanzen verbessert. Eine histologisch nachweisbare Schädigung der Organe durch die LPS-Applikation war kaum detektierbar und aus diesem Grund konnten auch auf dieser Ebene keine Effekte der Schutzstoffe eindeutig nachgewiesen werden. Die durch LPS erhöhten Konzentrationen der Zytokine in den verschiedenen Organen konnten durch Glycin teilweise vermindert werden. Pyruvat zeigte in allen Organen einen senkenden Effekt auf einige der gemessenen Zytokine. Resveratrol zeigte einen erhöhenden Effekt auf die Zytokine in den Organen und Nitrit hatte darauf kaum einen Einfluss. Die Einwanderung entzündlicher Infiltrate in die Leber konnte durch alle Substanzen mit Ausnahme von Resveratrol verringert werden. Der im Plasma gemessene LPS-induzierte Anstieg der Zytokine wurde durch die Schutzstoffe unterschiedlich stark gemindert. Keine Substanz hatte einen Effekt auf die Nitrit + Nitrat-Konzentrationen im Plasma. Zusammenfassend zeigte sich, dass bereits geringe Dosen von intravenösem Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit sowohl den MAP als auch die Plasmamarker für Organschädigung und Funktion deutlich verbessern konnten.

Die Hemmung der Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine scheint nicht obligat für die insgesamt protektive Wirkung der untersuchten Substanzen zu sein. Vielmehr scheint dies stattdessen mit der Minderung der LPS-induzierten Gewebeischämie erklärt werden zu können, wie z. B. durch die Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion oder durch den direkten Schutz vor ischämischer Gewebeschädigung. Selbstverständlich kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass andere anti-inflammatorische Eigenschaften der Substanzen als die hier untersuchten und ausschließlich das Zytokinnetzwerk betreffende entscheidend an der Gewebeprotektion beteiligt sind. Unterschiede in den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen und denen vorangegangener Untersuchungen könnten auf Unterschiede in der Dosierung und der Art der Verabreichung der Substanzen zurückzuführen sein. Somit sind weitere Untersuchungen nötig, um die zugrunde liegenden Schutzmechanismen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und Nitrit weitergehend zu enthüllen und mögliche Synergieeffekte von Kombinationen dieser Substanzen zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Akira, S. and Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.
2. Christaki, E. and Opal, S. M. (2008): Is the mortality rate for septic shock really decreasing? *Curr Opin Crit Care* **14**, 580-586.
3. Angus, D. C., Pereira, C. A. P. and Silva E. (2006): Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **6**, 207-212.
4. Niederbichler, A. D., Ipaktchi, K., Jokuszies, A., Hirsch, T., Altintas, M. A., Handschin, A. E., Busch, K. H., Gellert, M., Steinau, H. U., Vogt, P. M. and Steinsträsser, L. (2009): Surgical intensive care medicine: Current therapy concepts for septic diseases. *Chirurg* **80**, 934-946.
5. Merx, M. W. and Weber, C. (2007): Sepsis and the heart. *Circulation* **116**, 793-802.
6. Müller-Werdan, U., Buerke, M., Christoph, A., Flieger, R. R., Heinroth, K., Herklotz, A., Ruß, M., Schlitt, A., Schmidt, H., Söffker, G. and Werdan, K (2006): Septische kardiomyopathie. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* **43**, 486-497.
7. Cohen, J. (2002): The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-891.
8. Geroulanos, S. and Douka, E. T. (2006): Historical perspective of the word "sepsis" [1]. *Intensive Care Med* **32**, 2077.
9. Lopes Ferreira, F., Peres Bota, D., Bross, A., Mélot, C. and Vincent, J. L. (2001): Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *J Am Med Assoc* **286**, 1754-1758.
10. Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L. and Ramsay, G. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* **29**, 530-538.
11. Buchholz, B. M. and Bauer, A. J. (2010): Membrane TLR signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 232-245.
12. Devi Ramnath, R., Weing, S., He, M., Sun, J., Zhang, H., Singh Bawa, M. and Bhatia, M. (2006): Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. *J Organ Dysfunct* **2**, 80-92.

13. Dinarello, C. A. (1997): Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* **112**, 321S-329S.
14. Tracey, K. J. and Cerami, A. (1993): Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 317-343.
15. Thiemermann, C. (1997): Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* **29**, 159-166.
16. Esmon, C. T. (2005): The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* **131**, 417-430.
17. Petrat, F., Boengler, K., Schulz, R. and de Groot, H. (2011a): Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischemia-reperfusion injury: current knowledge. *Br J Pharmacol* **165**, 2059-2072.
18. Weinberg, J. M., Davis, J. A., Abarzua, M. and Rajan, T. (1987): Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin Invest* **80**, 1446-1454.
19. Petrat, F., Drowatzky, J., Boengler, K., Finckh, B., Schmitz, K. J., Schulz, R. and de Groot, H. (2011b): Protection from glycine at low doses in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *Eur Surg Res* **46**, 180-187.
20. Habib, M. M., Hodgson, H. J. F. and Davidson, B. R. (2006): The role of glycine in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* **12**, 2953-2967.
21. Sheth, H., Hafez, T., Glantzounis, G. K., Seifalian, A. M., Fuller, B. and Davidson, B. R. (2011): Glycine maintains mitochondrial activity and bile composition following warm liver ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 194-200.
22. Bruck, R., Wardi, J., Aeed, H., Avni, Y., Shirin, H., Avinoach, I., Shakhmurov, M. and HersHKoviz, R. (2003): Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int* **23**, 276-282.
23. Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B. and Lemasters, J. J. (2003): L-glycine: A novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**, 229-240.
24. Xu, F. L., You, H. B., Li, X. H., Chen, X. F., Liu, Z. J. and Gong, J. P. (2008): Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. *Am J Surg* **196**, 139-148.

25. Venkatachalam, M. A., Weinberg, J. M., Patel, Y., Saikumar, P. and Dong, Z. (1996): Cytoprotection of kidney epithelial cells by compounds that target amino acid gated chloride channels. *Kidney Int* **49**, 449-460.
26. Nishimura, Y. and Lemasters, J. J. (2001): Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ* **8**, 850-858.
27. Ikejima, K., Qu, W., Stachlewitz, R. F. and Thurman, R. G. (1997): Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **272**, G1581-G1586.
28. Froh, M., Thurman, R. G. and Wheeler M. D. (2002): Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G856-G863.
29. Kao, K. K. and Fink, M. P. (2010): The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol* **80**, 151-159.
30. Holleman, A. F. (1904): Notice sur l'action de l'eau oxygénée sur les acides α -cétoniques et sur les dicétones 1. 2. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas et de la Belgique* **23**, 169-172.
31. Ervens, B., Gligorovski, S. and Herrmann H. (2003): Temperature-dependent rate constants for hydroxyl radical reactions with organic compounds in aqueous solutions. *Phys Chem Chem Phys* **5**, 1811-1824.
32. Varma, S. D. and Hegde, K. R. (2007): Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol Cell Biochem* **298**, 199-204.
33. Petrat, F., Rönn, T. and de Groot, H. (2011c): Protection by pyruvate infusion in a rat model of severe intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* **167**, e93-e101.
34. Sileri, P., Schena, S., Morini, S., Rastellini, C., Pham, S., Benedetti, E. and Cicalese, L. (2001): Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation* **72**, 27-30.
35. Cicalese, L., Yacoub, W., Subbotin, V., Kuddus, R., Fung, J. J., Stanko, R. and Rao, A. S. (1999): Pyruvate inhibits the chronic damage which ensues after ischemia/reperfusion injury of kidneys. *Transplant Proc* **31**, 1033.
36. Sharma, P. and Mongan, P. D. (2010): Hypertonic sodium pyruvate solution is more effective than ringer's ethyl pyruvate in the treatment of hemorrhagic shock. *Shock* **33**, 532-540.

37. Fink, M. P. (2008): Ethyl pyruvate. *Curr Opin Anaesthesiol* **21**, 160-167.
38. Kefer, J., Rahman, A., Anwar, K. N. and Malik, A. B. (2001): Decreased oxidant buffering impairs NF- κ B activation and ICAM-1 transcription in endothelial cells. *Shock* **15**, 11-15.
39. Kumar, S., Rabson, A. B. and Gelinas C. (1992): The RxxRxRxxC motif conserved in all Rel/ κ B proteins is essential for the DNA-binding activity and redox regulation of the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol* **12**, 3094-3106.
40. García-Pineros, A. J., Castro, V., Mora, G., Schmidt, T. J., Strunck, E., Pahl, H. L. and Merfort, I. (2001): Cysteine 38 in p65/NF- κ B Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *J Biol Chem* **276**, 39713-39720.
41. Wang, Q., van Hoecke, M., Tang, X. N., Lee, H., Zheng, Z., Swanson, R. A. and Yenari, M. A. (2009): Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. *Neurobiol Dis* **36**, 223-231.
42. Shakibaei, M., Harikumar, K. B. and Aggarwal B. B. (2009): Review: Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol Nutr Food Res* **53**, 115-128.
43. Wang, Z., Huang, Y. Zou, J., Cao, K., Xu, Y. and Wu, J. M. (2002): Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* **9**, 77-79.
44. Gedik, E., Girgin, S. Ozturk, H., Obay, B. D. and Buyukbayram, H. (2008): Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* **14**, 7101-7106.
45. Ozkan, O. V., Yuzbasioglu, M. F. Ciralik, H., Kurutas, E. B., Yonden, Z., Aydin, M., Bulbuloglu, E., Semerci, E., Goksu, M., Atli, Y., Bakan, V. and Duran, N. (2009): Resveratrol, a natural antioxidant attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tohoku J Exp Med* **218**, 251-258.
46. Petrat, F. and de Groot, H. (2011): Protection against severe intestinal ischemia/reperfusion injury in rats by intravenous resveratrol. *J Surg Res* **167**, e145-e155.
47. Della Morte, D., Dave, K. R. and Perez-Pinzon M. A. (2007): Resveratrol pretreatment protects brain from cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, BP42-04H.
48. Baur, J. A. and Sinclair, D. A. (2006): Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 493-506.

49. Banerjee, S., Bueso-Ramos, C. and Aggarwal B. B. (2002): Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: Role of nuclear factor- κ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* **62**, 4945-4954.
50. Manna, S. K., Mukhopadhyay, A. and Aggarwal B. B. (2000): Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* **164**, 6509-6519.
51. Lundberg, J. O., Weitzberg, E. and Gladwin M. T. (2008): The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 156-167.
52. Dezfulian, C., Raat, N., Shiva S. and Gladwin M. T. (2007): Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res* **75**, 327-338.
53. Van Faassen, E. E., Bahrami, S., Feelisch, M., Hogg, N., Kelm, M., Kim-Shapiro, D. B., Kozlov, A. V., Li, H., Lundberg, J. O., Mason, R., Nohl, H., Rassaf, T., Samouilov, A., Slama-Schwok, A., Shiva, S., Vanin, A. F., Weitzberg, E., Zweier, J. and Gladwin, M. T. (2009): Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev* **29**, 683-741.
54. Tripatara, P., Patel, N. S. A., Webb, A., Rathod, K., Lecomte, F. M. J., Mazzon, E., Cuzzocrea, S., Yaqoob, M. M., Ahluwalia, A. and Thiernemann, C. (2007): Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: Role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol* **18**, 570-580.
55. Lü, P., Liu, F., Yao, Z., Wang, C. Y., Chen, D. D., Tian, Y., Zhang, J. H. and Wu, Y. H. (2005): Nitrite-derived nitric oxide by xanthine oxidoreductase protects the liver against ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **4**, 350-355.
56. Duranski, M. R., Greer, J. J. M., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., Patel, R. P., Yet, S. F., Wang, X., Kevil, C. G., Gladwin, M. T. and Lefer, D. J. (2005): Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* **115**, 1232-1240.

57. Jung, K. H., Chu, K., Ko, S. Y., Lee, S. T., Sinn, D. I., Park, D. K., Kim, J. M., Song, E. C., Kim, M. and Roh, J. K. (2006): Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke* **37**, 2744-2750.
58. Shiva, S., Sack, M. N., Greer, J. J., Duranski, M., Ringwood, L. A., Burwell, L., Wang, X., Macarthur, P. H., Shoja, A., Raghavachari, N., Calvert, J. W., Brookes, P. S., Lefer, D. J. and Gladwin, M. T. (2007): Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* **204**, 2089-2102.
59. Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S. and Hobbs, A. J. (2001): Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* **166**, 3873-3881.
60. Cauwels, A., Buys, E. S., Thoonen, R., Geary, L., Delanghe, J., Shiva, S. and Brouckaert, P. (2009): Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. *J Exp Med* **206**, 2915-2924.
61. Guedel, A. E. (1937): *Inhalation Anesthesia: A Fundamental Guide*. New York, Macmillan.
62. Green, L. C., Wagner, D. A., and Glogowski J. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**, 131-138.
63. Petrat, F., Swoboda, S., de Groot, H. and Schmitz, K. J. (2010): Quantification of ischemia-reperfusion injury to the small intestine using a macroscopic score. *J Invest Surg* **23**, 208-217.
64. Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D. and Rothstein, G. (1982): Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* **78**, 206-209.
65. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
66. Chiu, C. J., McArdle, A. H., Brown, R., Scott, H. J. and Gurd, F. N. (1970): Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* **101**, 478-483.
67. Park, P. O., Haglund, U., Bulkley, G. B. and Falt, K. (1990): The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* **107**, 574-480.

68. Szabo, C., Mitchell, J. A., Thiemermann, C. and Vane, J. R. (1993): Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. *Br J Pharmacol* **108**, 786-792.
69. Yilmaz, M. S., Goktalay, G., Millington, W. R., Myer, B. S., Cutrera, R. A. and Feleder, C. (2008): Lipopolysaccharide-induced hypotension is mediated by a neural pathway involving the vagus nerve, the nucleus tractus solitarius and alpha-adrenergic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area. *J. Neuroimmunol.* **203**, 39-49.
70. Liu, C. Y., Mueller, M. H., Grundy, D. and Kreis, M. E. (2007): Vagal modulation of intestinal afferent sensitivity to systemic LPS in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1213-G1220.
71. Karetzky, M. S. and Cain, S. M. (1969): Effect of sodium pyruvate infusion on acid-base balance and gas exchange in the dog. *Am J Physiol* **217**, 1472-1476.
72. Zhou, F. Q. (2005): Pyruvate in the correction of intracellular acidosis: A metabolic basis as a novel superior buffer. *Am J Nephrol* **25**, 55-63.
73. Dushianthan, A., Grocott, M. P. W., Postle, A. D. and Cusack, R. (2011): Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J* **87**, 612-622.
74. Cao, Q., Jing, C., Tang, X., Yin, Y., Han, X. and Wu, W. (2011): Protective Effect of Resveratrol on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. *Anat Rec* **294**, 527-532.
75. Aroian, R. and van der Goot, F. G. (2007): Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol* **10**, 57-61.
76. Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Groot, F. G. and Freche, B. (2008): Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol Life Sci* **65**, 493-507.
77. Bull, B. S. and Kuhn, I. N. (1970): The Production of Schistocytes by Fibrin Strands (A Scanning Electron Microscope Study). *Blood* **35**, 104-111.
78. Heyes, H., Kohle, W. and Slijepcevic, B. (1976): The appearance of schistocytes in the peripheral blood in correlation to the degree of disseminated intravascular coagulation. An experimental study in rats. *Haemostasis* **5**, 66-73.

-
79. Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F. and Huber-Lang, M. (2011): New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* **17**, 317-29.
 80. Pöschl, J. M., Leray, C., Ruef, P., Cazenave, J. P. and Linderkamp, O. (2003): Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and in vitro. *Crit Care Med* **31**, 924-8.
 81. Lang, F., Gulbins, E., Lang, P. A., Zappulla, D. and Foller, M. (2010): Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* **26**, 21-8.
 82. Sebai, H., Sani, M., Ghanem-Boughanmi, N. and Aouani, E. (2010): Prevention of lipopolysaccharide-induced mouse lethality by resveratrol. *Food Chem Toxicol* **48**, 1543-1549.
 83. Ikejima, K., Iimuro, Y., Forman, D. T. and Thurman, R. G. (1996): A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **271**, G97-G103.
 84. Fink, M. P. (2007): Ethyl pyruvate: A novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med* **261**, 349-362.
 85. Panaro, M. A., Carofiglio, V., Acquafredda, A., Cavallo, P. and Cianciulli, A. (2011): Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *Br J Nutr* DOI: 10.1017/S0007114511007227.
 86. Capiralla, H., Vingtdoux, V., Zhao, H., Sankowski, R., Al-Abed, Y., Davies, P. and Marambaud, P. (2012): Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kB/STAT signaling cascade. *J Neurochem* **120**, 461-472.
 87. Larrosa, M., Azorín-Ortuño, M., Yanez-Gascón, M. J., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. and Espín, J. C. (2011): Lack of effect of oral administration of resveratrol in LPS-induced systemic inflammation. *Eur J Nutr* **50**, 673-680.
 88. Katsuyama, K., Shichiri, M., Marumo, F. and Hirata, Y. (1998): NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kB activation by interfering with phosphorylation and degradation of I κ B- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1796-1802.
 89. Davies, C. A., Rocks, S. A., O'Shaughnessy, M. C., Perrett, D. and Winyard, P. G. (2003): Analysis of nitrite and nitrate in the study of inflammation. *Methods Mol Biol* **225**, 305-320.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

BE	Basenüberschuss (englisch „Base excess“)
CE	Chloracetat-Esterase
CK-NAC	Creatin-Kinase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
INR	International normalized ratio
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Januskinase
KGW	Körpergewicht
Lac	Laktat
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MCH	Mittlerer Hämoglobingehalt pro Erythrozyt
MCHC	Mittlere Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt
MCV	Mittleres Erythrozytenvolumen
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
P _{CO2}	Kohlendioxidpartialdruck (im Blut)
P _{O2}	Sauerstoffpartialdruck (im Blut)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome

SOFA	Sequential organ failure assessment
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

7.2. Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot, Frank Petrat. Inhibition of the inflammatory cytokine response is not mandatory for protection against lipopolysaccharide-induced shock by low-dose infusions of glycine, pyruvate, resveratrol and nitrite in rats. Zur Publikation bei "Shock" eingereicht.

Michael Adamzik*, **Tim Hamburger***, Frank Petrat, Jürgen Peters, Herbert de Groot, Matthias. Hartmann. Free hemoglobin for the prediction of outcome in severe sepsis: Comparison to SAPS II- and SOFA scores. Im Druck bei "Critical Care".

*Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zum Artikel beigetragen.

Frank Petrat, Matthias Hartmann, Ernst Schmidt, Florian Grabellus, **Tim Hamburger** und Herbert de Groot (2012). Toluidine blue for the intraoperative staining of ureters. Studies on the safe administration in rats.

Langenbecks Arch. Surg., im Druck, DOI 10.1007/s00423-012-0907-y

Wissenschaftliche Vorträge

Tim Hamburger: „Endotoxinschock der Ratte (Modell)“.

Vortrag, 2. Arbeitstreffen „Protektion und Regeneration“, 09.–10.10.2009 in Marienthal

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot und Frank Petrat. „Akute, LPS-induzierte Inflammation (Endotoxinschock) in der Ratte: Wirkungen von Glycin, Pyruvat, Resveratrol und

Nitrit.“ Vortrag, 3. Arbeitstreffen „Protektion und Regeneration“, 23.–24.09.2010 in Marienthal

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot und Frank Petrat. „Akuter, LPS-induzierter septischer Schock in der Ratte: Wirkungen von Glycin, Pyruvat und Resveratrol“.

Vortrag, 16. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“, 25.–27.11.2010 in Xanten

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot und Frank Petrat. “Acute LPS-induced septic Shock in the rat: Effects of glycine, pyruvate and resveratrol”.

Vortrag, Biome-Seminar (Graduiertenschule) am 14.12.2010 in Essen

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot und Frank Petrat. „So schützt Nitrit die Ratte im septischen Schock!“.

Vortrag, 17. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung: Mechanismen, Protektion und Therapie“, 24.–26.11.2011 in Xanten

Posterpräsentationen

Tim Hamburger, Martina Broecker-Preuss, Matthias Hartmann, Fritz-Ulrich Schade, Herbert de Groot und Frank Petrat. „Akuter, LPS-induzierter septischer Schock in der Ratte – Effekte von Glycin, Pyruvat und Resveratrol“.

Postervortrag, Forschungstag der Medizinischen Fakultät am 12.11.2010 in Essen

7.3. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.4. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchungen zum Einfluss niedrig dosierter Glycin-, Pyruvat-, Resveratrol- und Nitrit-Infusionen auf die Organschädigung, systemischen Folgen und Inflammation im akuten lipopolysaccharid-induzierten Schock der Ratte“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im September 2012

7.5. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2008 bis März 2012 im Institut für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Dank gebührt an erster Stelle

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

für die Bereitstellung einer wissenschaftlichen Arbeitsstelle und die Überlassung des interessanten Themas sowie die vielen wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Dem Betreuer meiner Arbeit,

Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Petrat,

bin ich dankbar für sein aufopferungsvolles Engagement, seine unerschöpfliche Geduld und die wissenschaftliche Begleitung dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie, die mich während dieser Zeit kollegial in ihrer Mitte aufgenommen haben.

Danken möchte ich zudem meiner Familie, die mir diesen beruflichen Weg ermöglicht hat und jederzeit ein offenes Ohr für meine Belange findet.